LULIBERINE und ENKEPHALINE

Synthesen, Struktur-Aktivitätsbeziehungen, neue Schutzgruppen und Kupplungsreagenzien

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Hartmut Echner
aus Konstanz

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536524_0003

LULIBERINE und ENKEPHALINE

Synthesen, Struktur-Aktivitätsbeziehungen, neue Schutzgruppen und Kupplungsreagenzien

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Hartmut Echner
aus Konstanz

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 13. September 1984

Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Voelter
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Eisele

Für meine Eltern und Ingeborg

Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterbrechungen in der Zeit von Dezember 1976 bis Dezember 1982 am Lehrstuhl für Organische Chemie I, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, Direktor Professor Dr. E. Bayer, unter wissenschaftlicher Anleitung von Professor Dr. W. Voelter angefertigt.

Herrn Professor Dr.W. Voelter
danke ich herzlich für die Themenstellung, sein stetes Interesse und seine großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. E. Bayer
danke ich für die großzügige Überlassung der Instituts-einrichtungen.

Der Konrad-Adenauer-Stiftung, Bonn,
danke ich für die Verleihung eines Promotionsstipendiums.

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

BOC	=	tert.-Butyloxycarbonyl-
Bzl	=	Benzylether
DCB	=	2.6-Dichlorbenzylether
DCCI	=	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	=	Dimethylformamid
DCHA	=	Dicyclohexylamin (ammonium)
EDT	=	Ethandithiol
FMOC	=	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
HOBt	=	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	=	N-Hydroxysuccinimid
HAc	=	Essigsäure
LH/FSH	=	Luteinisierendes/Follikel-stimulierendes Hormon
Mbs	=	p-Methoxybenzolsulfonyl-
OMe	=	Methylester
OBzl	=	Benzylester
OBut	=	tert.-Butylester
OPic	=	4-Picolylester
OPCP	=	Pentachlorphenylester
OCP	=	2.4.5-Trichlorphenylester
TFA	=	Trifluoressigsäure
TIP	=	2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-
TMbs	=	m-Trifluormethylbenzolsulfonyl-
Z	=	Benzyloxycarbonyl-
ZTE	=	1-Benzyloxycarbonylamino-2.2.2-trifluorethyl

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Die Entdeckung der Hypothalamus-Releasinghormone	1
2.	Physiologie des LH/FSH-Releasinghormons	4
2.1	Aufbau des hypothalamisch-hypophysären Systems	4
3,	Struktur des LH/FSH-Releasinghormons	8
3.1	Strukturaufklärung der Primärsequenz	8
3.2	Strukturaufklärung der Sekundärstruktur	9
3.2.1	Semiempirische Konformationsuntersuchungen	9
3.2.2	Kernresonanzuntersuchungen	12
3.2.2.1	^{1}H-Kernresonanzuntersuchungen	12
3.2.2.2	^{13}C-Kernresonanzuntersuchungen	15
3.2.2.3	Spin-Gitter-Relaxationszeiten	17
3.2.3	Chiroptische Untersuchungen	19
4.	Opioide Peptide	21
4.1	Entdeckung von körpereigenen Opiaten	21
4.2	Physiologie der Enkephaline	24
4.3	Die Struktur der Enkephaline	26
4.3.1	Semiempirische Konformationsenergieberechnungen	26
4.3.2	Kernresonanzuntersuchungen der Enkephaline	31

		Seite
4.3.2.1	^{1}H-NMR-Untersuchungen	31
4.3.2.2	^{13}C-NMR-Untersuchungen	33
4.3.4	Raman-Spektrum von Leucin-Enkephalin	37
4.3.5	CD-Spektrum von Methionin-Enkephalin	39
4.3.6	Röntgenstrukturanalyse von Leucin-Enkephalin	39
4.4	Struktur-Aktivitätsbeziehungen	42
5.	Peptidsynthesen	47
5.1	Ziel der Peptidsynthese	47
5.2	Begründung und Zielstellung des Themas	48
5.3	Synthese des LH/FSH-"Releasing"-Hormons	53
5.4	Synthese des Decapeptidamids Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-β-Ala-NH_2	60
5.5	Synthese des Decapeptidamids Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-β-Ala-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2	66
5.6	Synthese des Decapeptidamids Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-β-Ala-Leu-Arg-Pro-β-Ala-NH_2	70
5.6.1	Synthese des Decapeptidamids Pyr-His Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-hPro-Gly-NH_2	74
5.7	Synthese des Decapeptidamids hPyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2	80
5.8	Synthese des Decapeptidamids Ecg-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2	85
5.9	Synthese des Decapeptidamids Pyr-D-Phe-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-β-Ala-NH_2	87

		Seite
6.	Synthese des Decapeptidamids Pyr-D-Phe-Trp-Ser-Tyr-β-Ala-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2	90
6.1	Synthese des Decapeptidamids Pyr-D-Phe-Trp-Ser-Tyr-β-Ala-Leu-Arg-Pro-β-Ala-NH_2	92
6.2	Synthese des Decapeptidamids Pyr-D-Phe-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-hPro-Gly-NH_2	95
7.	Entwicklung neuerer Schutzgruppen vom Sulfonamidtyp	96
7.1	p-Methoxybenzolsulfonyl- als Schutzgruppe für Lysin und Ornithin	97
7.2	p-Methoxybenzolsulfonyl- als Imidazol-Schutzgruppe	103
7.3	p-Methoxybenzolsulfonyl- als α-Aminoschutz	105
7.4	2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-Schutzgruppe	109
7.4.1	Darstellung von 2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-(TIP)-Verbindungen des Arginins und Histidins	110
7.5	Die m-Trifluormethylbenzolsulfonyl-(TMbs)-Schutzgruppe	115
8.	Synthese des Decapeptidamids Pyr-His Trp-Ser-Tyr-γ-Abu-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2	117

		Seite
8.1	Synthese von Tuftsin	119
9.	Die Entwicklung neuer Kupplungsreagenzien	121
9.2	Synthese von Succinimido-N-oxy-tris-(dimethylamino)phosphonium-hexafluorphosphat	124
9.3	Weitere Kupplungsreagenzien vom Typ des BOP-Reagenz	126
9.4	Kupplungsreagenzien auf der Basis von O-Benzotriazolyl-N.N'-tetramethylharnstoff-salzen	128
9.5	Racemattests	133
9.6	Polymere Kupplungsreagenzien	137
9.6.1	Polymere Kupplungsreagenzien auf der Basis von polymerem "HMPT"	137
9.6.2	Polymere Kupplungsreagenzien auf der Basis von polymerem "Tetramethylharnstoff"	140
10.	Synthese von Enkephalinderivaten	141
10.1	Synthese des Leucin-Enkephalins	141
10.2	Synthese des Methionin-Enkephalins	146
10.3	Synthese des {Arg^6,Phe^7}-Methionin-Enkephalins	151
10.4	Synthese des Methionin-Enkephalinamids	153

		Seite
10.5	Synthese des {Sar^3}-Methionin-Enkephalinamids	161
10.6	Synthese des {Ala^2,D-Tyr^3}-Methionin-Enkephalinamids	163
11.	CD-Untersuchungen	167
11.1	Zirkulardichroismus von Peptiden	167
11.2	CD-Messungen an Analogen des LH/FSH-"Releasing"-Hormons	169
11.3	CD-Spektren der Enkephaline	174
12.	Biologische Tests	177
13.	Experimenteller Teil	186
14.	Zusammenfassung	355
15.	Literaturverzeichnis	360

1. Einleitung

Das Hormonsystem dient biologischen Induviduen neben dem Nerven- und dem Immunsystem als Kommunikationsmittel. Etwa 70 % aller bisher bekannten bioregulatorischen Faktoren haben Peptidstruktur. In der Hierarchie der endokrinen Regulation sind sie in Organismen als Transmitter, "Releaser", glandotrope und glanduläre Hormone sowie als lokal regulierende Faktoren auf Organ- und Zellebene anzutreffen. Diese Peptid- und Eiweißmoleküle tragen vielfälltigste biologische Informationen in ihrer Aminosäuresequenz verschlüsselt, die mit einem ebenso vielfältigen System selektiver zellulärer Rezeptoren durch Bindung erkannt und zu entsprechenden biologischen Effekten umgesetzt werden.

Daß die Hormonsekretion des Hypophysenvorderlappens durch Substanzen, die im Hypothalamus gebildet werden, kontrolliert wird, wurde schon in den Jahren 1937-1949 von Hinsey[1] sowie von Green und Harris[2] postuliert.

1.1 Die Entdeckung der Hypothalamus-"Releasing"-Hormone

Der Hypothalamus ist ein kleines Gebiet des Zwischenhirns (Diencephalon), welches den hinteren Teil des Prosencephalons bildet[3]. Das Prosencephalon besteht aus Hypothalamus, Thalamus, Metathalamus und Epithalamus. G. Harris[2] konnte nachweisen, daß die Unterbrechung der Portalgefäße zwischen Emminentia mediana und der Hypophyse eine Veränderung der Funktion der Erfolgsorgane Schilddrüse, Nebennieren und Gonaden bewirkt.

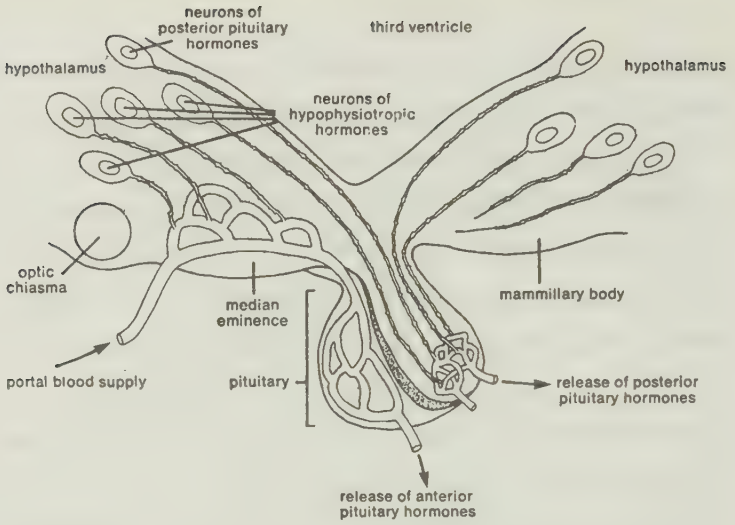


Abbildung 1: Anatomischer Aufbau des Hypothalamus-Hypophysensystems

Aus dieser Tatsache schloß Harris, daß im Hypothalamus erzeugte hormonale Substanzen im Bereich Emminentia mediana an die Portalgefäße abgegeben werden und damit die Hypophyse beeinflussen.

In der folgenden Zeit wurden mindestens 10 Hypothalamushormone postuliert[4], die inhibierenden oder freisetzenden Charakter besitzen. Drei dieser Hypothalamushormone konnten unterdessen isoliert, in ihrer Struktur aufgeklärt und auch synthetisiert werden.

Hypothalamus-Hormone mit Hormon-freisetzender- bzw. Hormon-ausschüttung-hemmender Wirkung

1.	Thyreotropin-freisetzendes Hormon (Thyroliberin)	TRH
2.	Luteinisierendes Hormon freisetzendes Hormon (Luliberin)	LH-RH
3.	Follikel-stimulierendes Hormon-freisetzendes Hormon (Foliberin)	FSH-RH
4.	Corticotropin-freisetzendes Hormon (Corticoliberin)	CRH
5.	Melanotropin-freisetzendes Hormon (Melanotropin)	MRH
6.	Prolactin-freisetzendes Hormon (Prolactoliberin)	PRH
7.	Wachstumshormon-freisetzendes Hormon (Somato-liberin)	GRH
8.	Wachstumshormonfreisetzung-hemmendes Hormon, (Somatostatin)	GIH
9.	Prolactinfreisetzung-hemmendes Hormon (Prolacto-statin)	PIH
10.	Melanotropinfreisetzung-hemmendes Hormon (Mela-nostatin)	MRIH

Tabelle 1: Vorläufige Liste der freisetzenden und hemmenden Hypothalamus-Hormone

Es sind dies das Thyroliberin, das Luliberin/Foliberin, das Corticoliberin, das Somatoliberin sowie das Somato-statin.

Über die Isolierung des LH/FSH-"Releasing"-Hormons berichteten Schally et al. (Nobelpreis für Medizin 1977)[4] (Isolierung aus Schweinehypothalami) und Amos und Guillemin (Nobelpreis für Medizin 1977)[5] (Isolierung aus Schafshypothalami).

2. Physiologie des LH/FSH-"Releasing"-Hormons

2.1 Aufbau des Hypothalamisch-hypophysären Systems

Die Verbindung zwischen Hypothalamus und Hypophyse stellt ein spezielles Gefäßsystem her, mit dessen Hilfe hypophysiotrope Hormone wie das TRH und das LH/FSH-RH aus dem Hypothalamus in die Hypophyse gelangen[6]. Dieser hämatogene Transport unterscheidet sich grundsätzlich von dem neuronalen der chemisch ähnlichen Hinterlappenhormone Vasopressin und Oxytocin, die ebenfalls im Hypothalamus gebildet werden.

Der Hypothalamus enthält zwei unterschiedliche Kernsysteme: Ein kleinzelliges (parvizelluläre Kerne), verantwortlich für die Steuerung der Hypophyse, sowie ein großzelliges (magnozelluläre Kerne), das für die Synthese der Hypophysenhinterlappenhormone sorgt. Die parvizellulären Kerne geben die Hypothalamus-Hormone in ein Kapillargebiet ab, das sich mit dem Portalsystem der Hypophyse vereinigt.

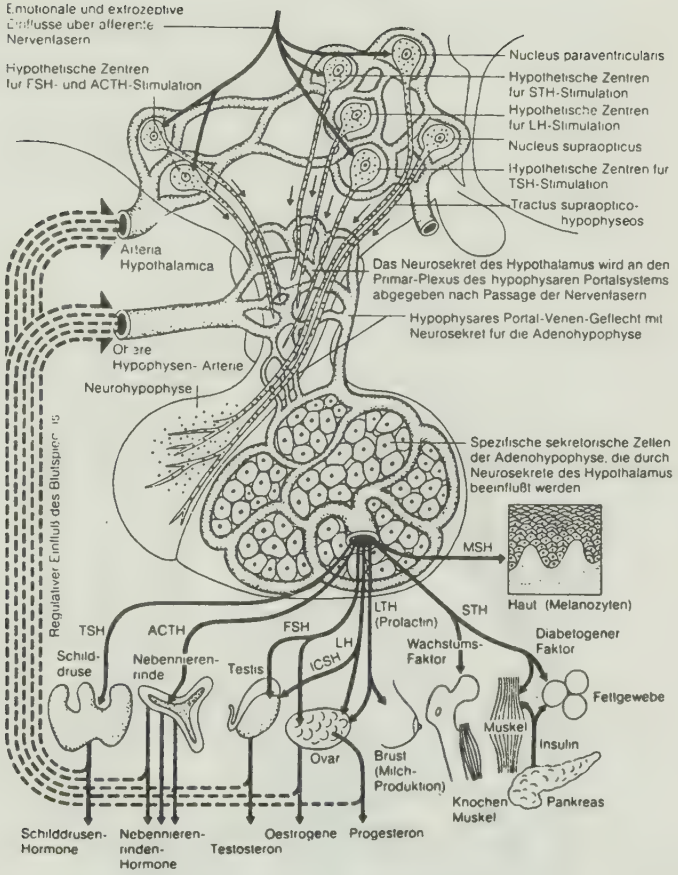


Abbildung 2: Steuerung und Wirkung der Hypophysen-Hormone durch den Hypothalamus

Während ein Teil der in das Portalsystem abgesonderten Hypo-

thalamus-Hormone von den Hypophysenzellen aufgenommen und durch Rezeptoren gebunden wird, wobei das "Releasing"-Hormon am Rezeptor über die Aktivierung von cyclo-AMP wirkt[7], wird der andere Teil in den Körperkreislauf ausgeschieden und durch Peptidasen abgebaut. Die Halbwertszeit im Blut beträgt etwa vier Minuten, wie durch Radioimmunoassaymessungen bestätigt werden konnte[271].

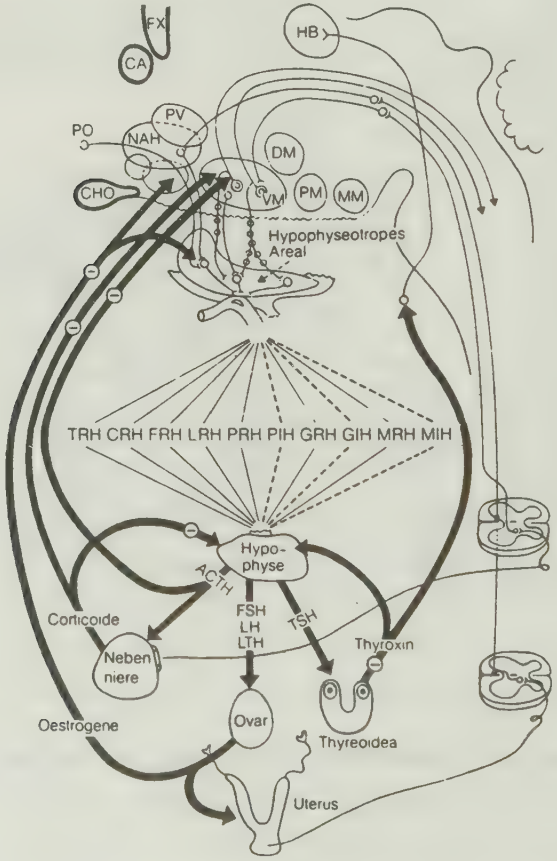


Abbildung 3: Wirkungs- und Rückkopplungsmechanismen der Hypothalamus-Hormone

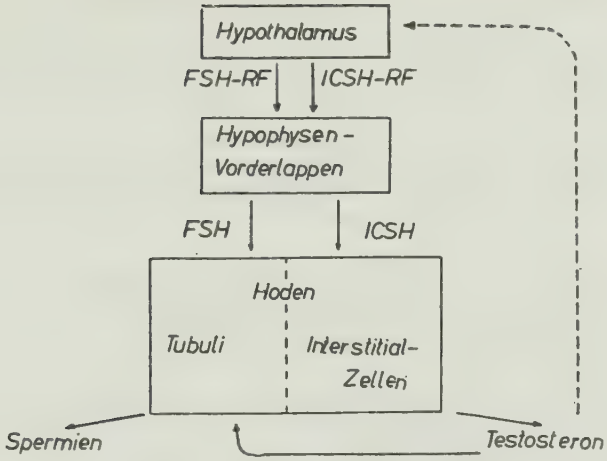


Abbildung 4: Regulation der Sexualvorgänge im männlichen Organismus

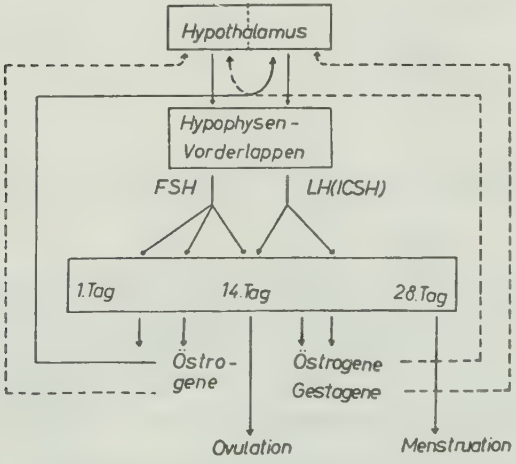


Abbildung 5: Regulation der Sexualvorgänge im weiblichen Organismus

Durch die hypophysäre Ausscheidung der Gonadotropine LH und FSH sowie Prolactin wird in den Gonaden bzw. Eierstöcken die Produktion der C_{18}- bzw. C_{19}-Steroidhormone stimuliert. Diese Steroide wirken ihrerseits wieder regulierend in einem sogenannten "Feedback"-Mechanismus auf den Hypothalamus ein.

3. Struktur des LH/FSH-"Releasing"-Hormons

3.1 Strukturaufklärung der Primärsequenz

Matsuo et al.[9] schlugen 1971 für das LH/FSH-"Releasing"-Hormon folgende Primärstruktur eines Decapeptidamids vor:

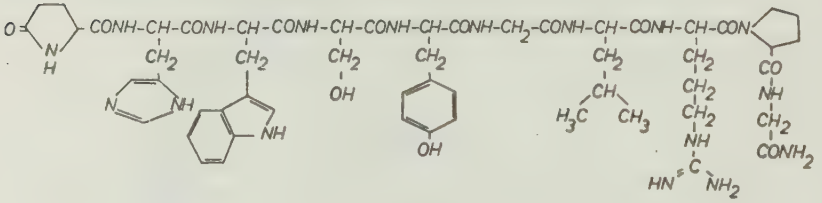


Abbildung 6: Primärsequenz des LH/FSH-"Releasing"-Hormons

Der Vorschlag basierte auf Ergebnissen, die aus Abbaureaktionen einer kombinierten Dansyl-Edmann-Technik im Mikromaßstab erhalten wurden. Außerdem wurde die Methode der selektiven Tritiummarkierung zur Ermittlung der C-terminalen Aminosäure angewandt. Daß die vorgeschlagene Sequenz korrekt war, konnten Matsuo et al.[10] durch enzymatische Abbaumethoden endgültig nachweisen.

Das von Amoss[5] aus Schafshypothalami isolierte LH/FSH-"Releasing"-Hormon wurde von Burgus[11] sequenziert. Es hat dieselbe Primärsequenz wie das aus Schweinehypothalami isolierte.

3.2 Strukturaufklärung der Sekundärstruktur

3.2.1 Semiempirische Konformationsuntersuchungen

Durch Verwendung empirischer Energieparameter und Funktionen[12,13], die die verschiedenen Energieanteile wie die elektrostatischen Wechselwirkungen, die Wasserstoffbrückenbindungen sowie die Torsionsenergie berücksichtigen, konnte Momany[14] nach der mathematischen Methode von Powell[15], in der Modifikation von Zangwill[16] verschiedene Konformere nied-

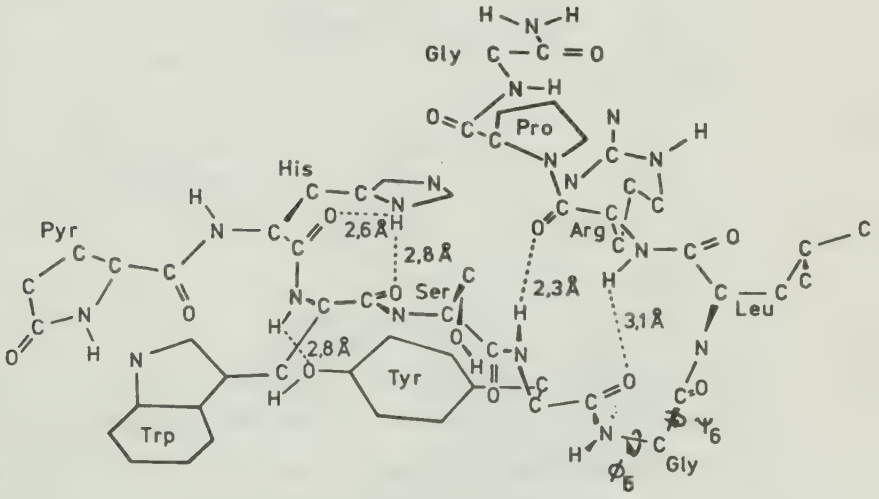
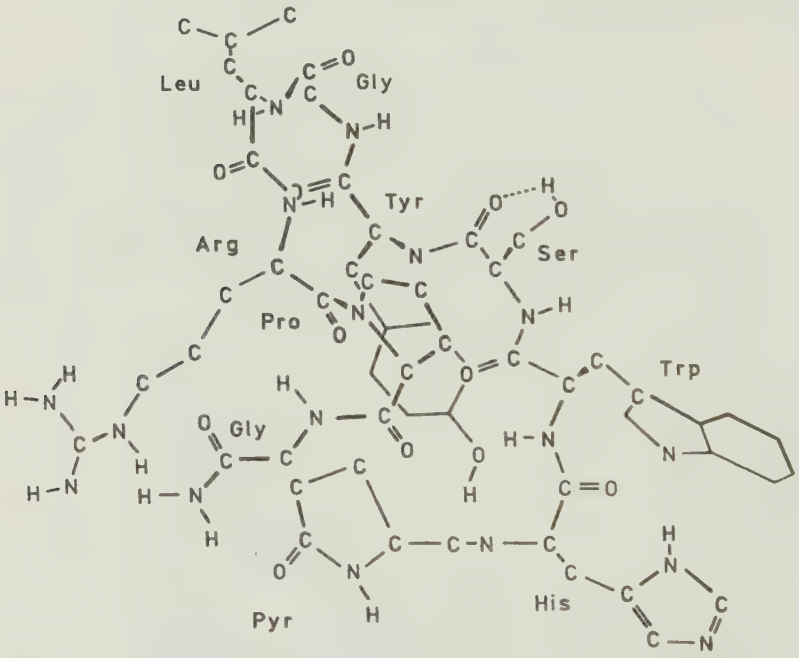


Abbildung 7: Konformer AA nach Momany[14]

rigster Energie berechnen. Durch Modellbetrachtungen konnten so die drei wahrscheinlichsten Konformeren AA, BB, CC des LH/FSH-Releasinghormons ermittelt werden.



Abblidung 8: Konformer CC nach Momany

Die Strukturen AA und BB unterscheiden sich nur durch die Dieder - Winkel ψ für Prolin, während die Konformation CC sich von AA und BB primär in den ψ-Werten für Histidin unterscheidet. Dieser Effekt hat eine Drehung des Histidinrings zur Folge, außerdem ändert sich die Orientierung für die Pyroglutaminsäure in Position 1.

Weiterhin kann aus diesen Berechnungen entnommen werden, daß keine starken Wasserstoffbrücken an den NH^{δ}- bzw. N^{ε}-Positionen existieren, so daß für das LH/FSH-"Releasing"-Hormon eine "Random coil"-ähnliche Struktur mit flexiblen Seitenketten angenommen werden kann.

Aufgrund der oben besprochenen "low energy"-Konformationen schlägt Momany[17] folgenden möglichen Mechanismus für die biologische Aktivität vor: Der in Abbildung 9 angegebene

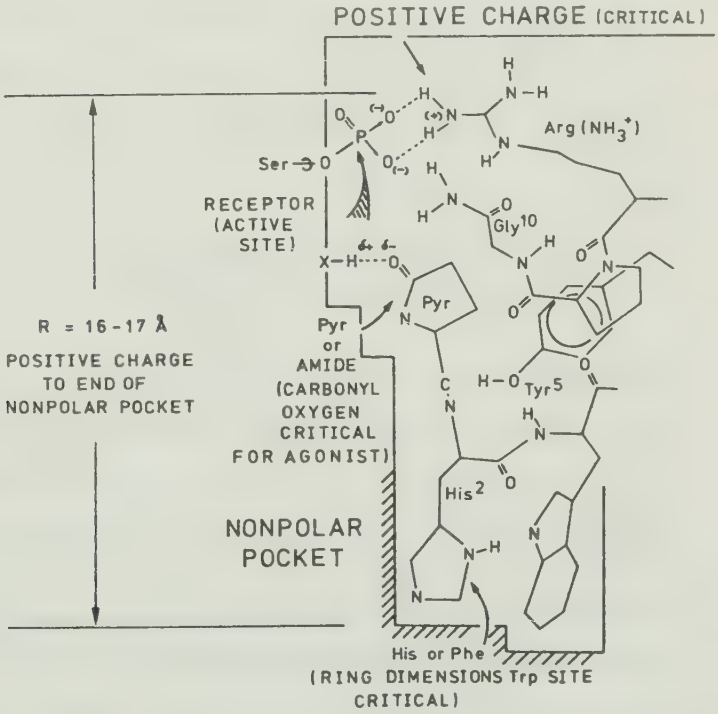


Abbildung 9: Hypothetischer Mechanismus für die LH/FSH-"Releasing"-Hormon-Aktivität nach Momany

Abstand R von etwa 16-17 Å sollte für alle Konformere etwa gleich groß sein. Auf die positive Ladung des Arginins erfolgt ein Angriff des Phosphatrestes eines phosphorylierten Serins, wobei sich die Lage des normalerweise abgeschirmten Arginins ändert. Durch die Aktivierung an dieser Seite kann der Pyroglutamylrest sich wahrscheinlich durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung unter Drehung des Systems verschieben. Dem Histidinringsystem, das in einer Art Tasche liegt, kommt hierbei wahrscheinlich die Rolle zu, den Abstand zum geladenen Argininrest aufrechtzuerhalten. Dies würde auch erklären, daß ein Austausch des Histidins in Position zwei des LH/FSH-Releasinghormons durch das sperrigere Phenylalanin zu einem Verlust der biologischen Aktivität führt.

3.2.2 Kernresonanzuntersuchungen

3.2.2.1 ^{1}H-Kernresonanzuntersuchungen

Spekulationen[18], daß das LH/FSH-Releasinghormon eine geordnete Struktur oder daß aufgrund von π-π Wechselwirkungen der Indolkern des Tryptophans in Position zwei und der Phenolkern des Tyrosins in Position fünf eine parallele Anordnung zueinander einnehmen könnten, konnte Wessels[19] durch ^{1}H-NMR-Untersuchungen entkräften. Es konnten auch keine intramolekularen Wasserstoffbrücken gefunden werden.

Durch Vergleichsmessungen kleiner Peptide aus der LH/FSH-Sequenz wie Pyr-His-OMe, H-Trp-Ser-Tyr-Gly-OH, Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-OH, H-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2 und Spinentkopplungs-

experimenten ist es Wessels gelungen, sämtliche Resonanzen zuzuordnen.

Ergebnisse[20,21,22,23]:

Über die Kopplungskonstanten und die dadurch ermittelten Dieder-Winkel α-CH-NH- (Φ) und α-CH-β-CH_2- (χ) lassen sich Aussagen über die Konformation und über die eventuell vorhandenen Wasserstoffbrücken machen.

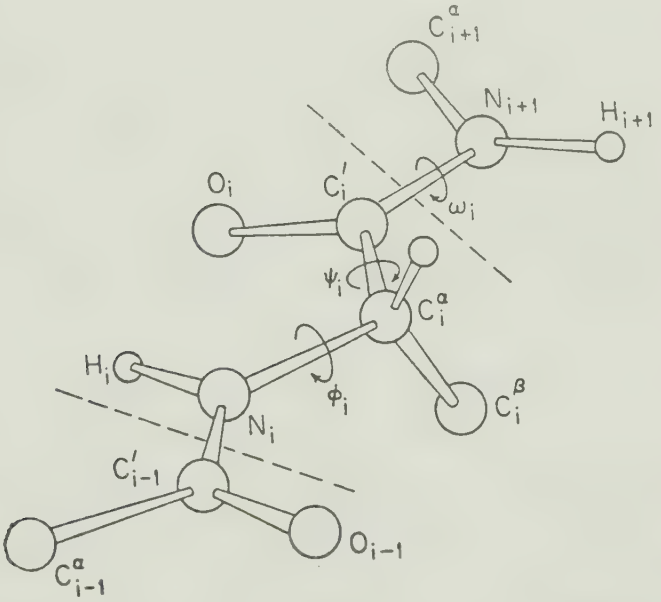


Abbildung 10: Peptideinheit mit IUPAC-Bezeichnungen

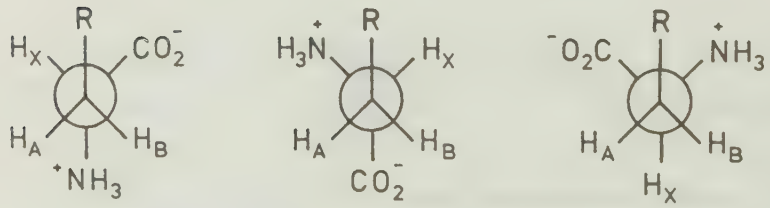
Für das Peptid-"Backbone"-Fragment α-CH-NH-, mit seiner vicinalen H-H-Kopplungskonstanten J_{NC}, sind Werte von 3-8 Hertz und damit energetisch bevorzugte Winkel Φ = - 100 bis - 60°

möglich. Über die Bystrov-Karplus-Beziehung[23]

$$J_{NC} = 8.9 \cos^2 (300 + \Phi) - 0.9 \cos (300 + \Phi) + 0.9 \sin^2 (300 + \Phi)$$

ist es möglich, die gemessenen Kopplungskonstanten J_{NC} für das LH/FSH-"Releasing"-Hormon mit Werten von 6.2-7.4 Hz einer Konformationsverteilung zuzuordnen, die einer "Random coil"-Konfiguration entspricht[20].

Um Aussagen über die Seitenkettenkonformationen zu machen, ist eine ABX-Analyse der α-CH-β-CH_2-Multipletts vonnöten, um die zwei vicinalen H-H-Spinkopplungskonstanten zu erhalten. Die Kopplungskonstanten geben Aufschluß über die Besetzung der Teilpopulationen p_I, p_{II} und p_{III} der drei Rotameren I, II und III für die Seitenketten in α-Aminosäuren[24].



(I) (II) (III)

Abbildung 11: Rotationsisomere von α-Aminosäuren

Die gemessenen Kopplungskonstanten J_{AX} und J_{BX} sind Mittelwerte der vicinalen gauche (J_g) und trans (J_t)-Kopplungskonstanten in den Rotameren I-III. Wessels nahm an, die Konstanten J_g und J_t seien identisch und benutzte die Literaturwerte J_g = 2.56 und J_t = 13.6 Hz[22]. Oft ist eine Zuordnung der A- und B-Rotameren nicht möglich und dadurch eine Unterscheidung zwischen Rotamer I und II nicht zu treffen.

Wessels fand für die Rotamerenpopulation der Serin-α-CH-β-CH_2-Seitenkette im LH/FSH-"Releasing"-Hormon für p_I+p_{II} = 0.54 und für p_{III} den Wert 0.47. Diese Werte sind in Einklang mit den für Serin in anderen Peptiden gefundenen[25]. Außer den Kopplungskonstanten der Serinseitenkette waren keine anderen Werte zugänglich, da sich die Signale bei der Messung in diesem Bereich zu stark überlappten. Die Messung der Temperaturabhängigkeit der Verschiebung der NH-Protonen[26] in D_2O und DMSO-d_6 ergaben keine Anhaltspunkte für eine starke intramolekulare Wasserstoffbrücke.

3.2.2.2 ^{13}C-Kernresonanzuntersuchungen

Die ersten ^{13}C-NMR-Messungen am LH/FSH-"Releasing"-Hormon wurden von Smith[27] et al. durchgeführt. Die von Wessels[19] zugeordneten Werte stimmen mit den von Smith im aromatischen Bereich gut überein, differieren aber bei der Zuordnung für die α-C-Atome von Serin, Histidin, Tryptophan und Leucin, sowie für das β-C-Atom von Leucin und das δ-C von Arginin.

Eine weitere ^{13}C-NMR-Studie, die auf Vergleich von gemessenen und errechneten Werten basiert, wurde von Deslauriers et al.[28] veröffentlicht. Der Berechnung des ^{13}C-NMR-Spektrums für LH/FSH-Releasinghormon bei pH 6.4 wurden die chemischen Verschiebungen der einzelnen freien Aminosäuren zugrunde gelegt[29,30].

Die Zuordnung der ^{13}C-Resonanzen für das N-terminale Peptid Pyr-His-Trp-NH_2 wurde durch Vergleich der Resonanzen[272] des TRH-Releasinghormons[31,32] gewonnen. Die Tryptophanwerte stimmen gut mit den Werten für die freie Aminosäure überein. Die Interpretation des C-terminalen Teils gelang durch Vergleich der Werte der Modellpeptide H-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2, H-Pro-Leu-Gly-NH_2, H-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2. Die Resonanzen für Prolin und Arginin konnten durch Vergleich der Werte der freien Aminosäuren als auch durch Heranziehung der Werte des Arg-Vasotocin[33] festgelegt werden. Man beobachtet auch hier den sogenannten "γ-sterischen Effekt[34]", d.h. die theoretisch zu erwartende Hochfeldverschiebung des α-C-Atoms des Arginins um ca. 2 ppm, wenn dieses mit dem Prolinrest verbunden ist.

Aus der Zuordnung kann ferner entnommen werden, daß die Arg-Pro-Bindung in trans-Konfiguration vorliegt. Weiterhin kommen die Autoren zu dem Schluß, daß weder eine von Humphries et al.[35] vorgeschlagene cis Bindung der His-Trp-Bindung vorliegt noch die schon oben erwähnten aufgrund von

π-π-Wechselwirkungen geforderten Ringstromeffekte als Folge der Parallelstellung des Indol- bzw. Phenolsystems.

3.2.2.3 Spin-Gitter-Relaxationszeitmessungen

T_1-Werte geben Auskunft über die Bewegung des Peptidgerüsts als auch der Seitenketten[36]. NT_1-Werte(N = direkt an C gebundene Wasserstoffatome) für das LH/FSH-Releasinghormon, gelöst in D_2O bei einem pH-Wert von 6.4 wurden von Deslauriers[28] bei 25 MHz und 68 MHz gemessen. Wie aus Abbildung 12 zu entnehmen ist, sind die NT_1-Werte für die "Backbone"- Atome sowohl am C-Terminus als auch am N-Terminus am

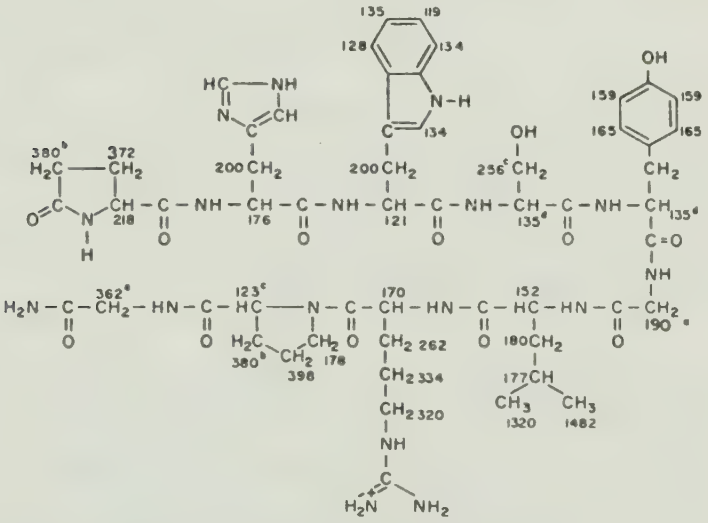


Abbildung 12: Primärsequenz des LH/FSH-Releasinghormons mit den zugehörigen NT_1-Werten

längsten. Auffällig ist die längere Relaxationszeit für das

α-C-Atom des Glycinrestes in Position 6 in Relation zu den Relaxationszeiten der benachbarten α-C-Atome. Dies deutet auf einen größeren Bewegungsspielraum des unsubstituierten Glycinrestes gegenüber den anderen Aminosäureresten mit ihren relativ sperrigen Seitenketten hin. Außer den ortho- und meta-Protonen des Phenolrings von Tyrosin, die etwas längere Relaxationszeiten als die des "Backbone" aufweisen, was auf eine gewisse interne Bewegung innerhalb des Phenolrings hindeutet, unterscheiden sich die anderen Relaxationszeiten der aromatischen Reste kaum von denen des "Backbone".

Für die cyclischen Aminosäuren Prolin und Pyroglutaminsäure beobachtet man für einzelne C-Atome längere NT_1-Werte, dies ist auf intracyclische Bewegungen zurückzuführen. Für Arginin in Peptiden ist charakteristisch[37], daß ein Unterschied zwischen den NT_1-Werten für das β- und γ-Atom besteht, während der Unterschied zwischen γ- und δ-Atom nicht signifikant ist.

Unter gewissen Bedingungen lassen sich, wenn Dipol-Dipol-Wechselwirkungen die dominanten Relaxationsmechanismen sind, Aussagen über die gesamtmolekulare Bewegung des Moleküls machen. Die T_1-Werte können mit der effektiven Korrelationszeit (τ_{eff}) verknüpft werden[38,39]. Im LH/FSH-"Releasing"-Hormon sind Dipol-Dipol-Relaxationsmechanismen, wie auch aus den Kern-Overhauser-Werten von 3.0 zu entnehmen ist, die vorherrschenden Mechanismen. Eine Tren-

nung des τ_{eff} in die Terme τ_{mol} (Aussage über die Gesamtrotationsdiffusion) und τ_{int} (Aussage über die intramolekularen Bewegungen) ist im Falle des LH/FSH-"Releasing"-Hormons wegen der segmentellen Bewegungen innerhalb des "Backbone" als auch der Seitenketten sehr kompliziert und nicht durchführbar.

3.2.3 Chiroptische Untersuchungen

Chiroptische Untersuchungen geben Auskunft über Konformationen von Molekülen in Lösung. Neuere Messungen von Cann et al.[40] und Mabrey et al.[41] kommen zu ähnlichen Ergebnissen für das LH/FSH-"Releasing"-Hormon.

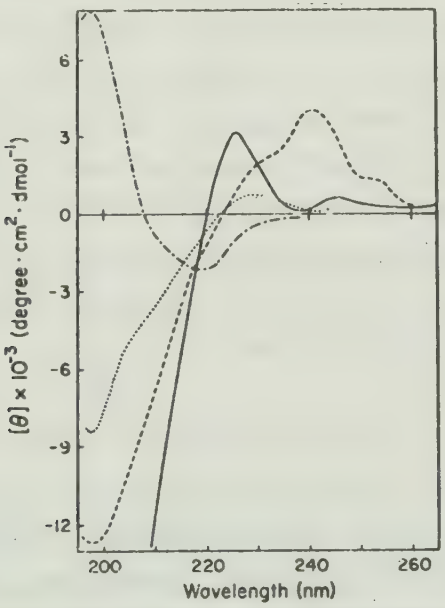


Abbildung 13: CD-Spektren des LH/FSH-RH in verschiedenen Lösungsmitteln: (-) Wasser, (-.-) Trifluorethanol, (...) in 20 % Trifluorethanol[41]

Die Messungen von Mabrey[41] für das Decapeptid zeigen eine Hauptbande bei 205 nm, wie es für ein "Random coil"-Peptid erwartet wird, zusätzlich tritt ein Maximum bei 230 nm auf. Bei 222 nm, dem Ort des $n \rightarrow \pi^*$-Übergangs der Peptidbindung in einer α-Helix[42] ist keine negative Bande zu sehen. Vergleiche mit den Spektren von Polyglutaminsäure in seiner helicalen Form geben keinen Anhaltspunkt dafür, daß das LH/FSH-"Releasing"-Hormon helicale Anteile enthält.

Um zu sehen, ob es dem Peptidhormon möglich ist, helicale- oder β-Faltblattstrukturen anzunehmen, wurde die Substanz in dem helixinduzierenden Lösungsmittel Trifluorethanol (28 % in Wasser) vermessen. Es wurde ein Spektrum erhalten, das sich von dem in Wasser vermessenen stark unterscheidet. Man erhält eine stark negative Mulde bei 218 nm, ein Kreuzungspunkt bei 207 nm und ein Maximum bei 198 nm. Dieses Spektrum ähnelt dem, das für Peptide mit einer β-Struktur charakteristisch ist. Messungen in 6 M Guanidin, einem Lösungsmittel, das Wasserstoffbrücken bricht[43], ergeben keine signifikanten Änderungen gegenüber den Werten, die in Wasser erhalten werden.

Das Spektrum des LH/FSH-"Releasing"-Hormons in Wasser von Cann und Mitarbeiter weist im Gegensatz zu dem Spektrum von Mabrey einen signifikanten Unterschied auf: es zeigt eine negative Schulter bei 217 nm, außerdem sind die Werte gegenüber dem Mabrey-Spektrum nach 197 nm respektive nach 229 nm verschoben.

Dies veranlaßte die Autoren an Hand einer Fülle von Modellpeptiden zu prüfen, ob diese Schulter eine spektrale Komponente des LH/FSH-"Releasing"-Hormons selbst ist. Eine nähere Untersuchung des C-terminalen Peptidfragments bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen Lösungsmitteln ergibt eine negative Bande bei 231 und eine positive bei 218 nm. Ein ähnliches Profil läßt sich auch für das C-terminale Tripeptid gewinnen. Vergleicht man das Spektrum des Tripeptids mit theoretischen Spektren für Peptide mit "β-bends", so kann man feststellen, daß eine "β-bend"-ähnliche Konfiguration, durch 4→1 Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff des Arginins in Position 9 und dem Amidproton des Glycinrestes in Position 10 möglich ist. Diese Möglichkeit konnte aber durch Vergleich mit Spektren von Derivaten, die C-terminal so verändert sind, daß keine Wasserstoffbrückenbildung mehr möglich ist, ausgeschlossen werden. Summa summarum kommt Cann ebenfalls zu dem Schluß, daß das LH/FSH-"Releasing"-Hormon in Wasser in Übereinstimmung mit den von Woody[44] gefundenen theoretischen Werten, eine "Random coil"-Konformation besitzt.

4 Opioide Peptide

4.1 Entdeckung von körpereigenen Opiaten

Opiate, d.h. analgetisch wirkende Substanzen pflanzlichen Ursprungs, sind schon seit Jahrhunderten bekannt. Daß diese Alkaloide, wie z.B. Morphium, die Schmerzempfindung hem-

men, die anderen Sinnesfunktionen dabei weitgehend unbeeinflußt lassen, ließ vermuten, daß der Organismus für diese Analgetika spezifische Rezeptoren besitzt.

1973 gelang es Terenius[45] und Snyder[46] mit Hilfe von radioaktiv markierten Opiaten, die Existenz dieser Rezeptoren nachzuweisen. Opiatrezeptoren werden nicht nur im zentralen Nervensystem (Gehirn, Rückenmark), sondern auch im peripheren Nervensystem (in bestimmten Darmabschnitten) als auch im Nebennierenmark gefunden. Die Rezeptoren des Gehirns sind unterschiedlich verteilt. Regionen hoher Rezeptordichte findet man im Gehirnstamm und im limbischen System, während man im Kleinhirn und in der weißen Gehirnsubstanz keine Rezeptoren findet.

Die Tatsache, daß der Organismus Opiatrezeptoren besitzt, ließ die Existenz körpereigener morphinähnlicher Substanzen vermuten. Hughes und Kosterlitz[47] konnten 1975 zwei opioide Pentapeptide isolieren und charakterisieren; diese unterscheiden sich nur durch die C-terminale Aminosäuren. Sie benannten diese Verbindungen mit den Sequenzen Tyr-Gly-Gly-Phe-Met bzw. Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu nach dem griechischen Wort enkephalos = Gehirn als Methionin- bzw. Leucin-Enkephalin.

Drei weitere Peptide mit Opiataktivität wurden kurz da-

nach aus Hypophysen isoliert. Sie unterscheiden sich nur in der Anzahl der Aminosäuren. Man bezeichnet sie als Endorphine (endogene Morphine) und zwar als

α-Endorphin (16 Aminosäuren)

β-Endorphin (31 Aminosäuren)

γ-Endorphin (17 Aminosäuren)

Vergleicht man die Sequenzen von Methionin-Enkephalin und der Endorphine mit den Sequenzen anderer bekannter Peptidhormone, so findet man, daß die Sequenz des Methionin-Enkephalin in der der Endorphine enthalten ist, diese wiederum in der Sequenz des β-Lipotropins, ein am Fettsäurestoffwechsel beteiligtes Hormon. Die Sequenz des β-Melanocyten-stimmulierenden Hormons ist ebenfalls im β-Lipotropin enthalten.(Position 84-101).

In rascher Folge wurden dann weitere Peptide mit analgetischer Wirkung entdeckt, wobei auffällt, daß die erst kürzlich isolierten und charakterisierten Dermorphine aus der Haut von Fröschen keine Strukturverwandtschaft mit den Enkephalinen mehr erkennen lassen:

Tabelle 2: Verschiedene, kürzlich entdeckte Opioidpeptide

Dynorphin aus Schweinehypophysen[48]

Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-X-X-X-X*

α-Neo-Endorphin aus Schweinehypothalami[49]

Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys

Met-Enkephalin-Arg^6-Phe^7 aus Gehirn und Nebenniere von Ratte, Rind und Mensch[50]

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe

Dermorphin aus Froschhaut[51]

Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH_2

Hyp^6-Dermorphin aus Froschhaut[51]

Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Hyp-Ser-NH_2

β-Casomorphine[273-275]

4.2 Physiologie der Enkephaline

Trotz intensiver Forschung ist man heute weit davon entfernt, die physiologische Rolle der endogenen opioiden Peptide zu verstehen. Gleichwohl muß man annehmen, daß die Enkephaline aufgrund ihres Vorkommens in gewissen Gehirnregionen bei der Übertragung von Sinnesreizen und bei der Atmung eine wichtige Rolle spielen, außerdem haben sie endokrine Kontrollfunktionen und beeinflussen das Verhalten. Ihr Vorkommen im limbischen System, einem evolutionsgeschichtlich sehr alten Teil des Gehirns, das an der Steuerung von Trieben und Emotionen beteiligt ist, läßt vermuten, daß Enkephaline auch an der Erzeugung von Euphorie und Wohlempfinden beteiligt sind. Das limbische System wiederum ist durch Nervenfasern mit dem Hypothalamus verbunden. Diese Hirnregion ist, wie durch die Entdeckung der Releasinghormone bewiesen, die oberste Schaltstation in der Hierarchie der hormonellen Regulation im Organismus sowie das oberste Integrationszentrum der vegetativen Zentren im Zentralnervensystem. Welche Rolle die Enke-

phaline bei diesen Regulationsvorgängen spielen, ist noch ziemlich unklar, obwohl bekannt ist, daß die Enkephaline die Freisetzung von Wachstumshormon und Prolactin stimulieren können. Weitere Opioideffekte sind die Hemmung der Atmungstätigkeit, die Erniedrigung der Körpertemperatur, die Beeinflussung im Lern- und Gedächtnisvermögen. Wie Morphium sind die opioiden Peptide starke, zur Sucht und Abhängigkeit führende Analgetika[276-279].

Ihr Vorkommen im Mittelhirn, das als Schmerzzentrum angesehen wird, ließ schon früh vermuten, daß die Enkephaline in irgendeiner Weise an der Regulation des Schmerzempfindens beteiligt sein könnten. Diese These wird dadurch unterstützt, daß, wenn man gewisse Bereiche des Gehirns elektrisch stimuliert, Analgesie erzeugt wird und Enkephaline ausgeschüttet werden; das gleiche gilt für die altchinesische Akupunkturmethode.

Daß Enkephaline auch an der neuronalen Informationsübertragung beteiligt sind, wird aus den hohen Enkephalinkonzentrationen innerhalb der Nervenzellen geschlossen[280]. Sie sind hier in den Synapsenenden konzentriert und werden wie die Neurotransmitter daraus durch chemische oder elektrische Stimulation freigesetzt und ebenso rasch wie diese wieder abgebaut. Außerdem sind die Enkephaline in der Lage, die Neurotransmitter Acetylcholin, Noradrenalin und Substanz P zu hemmen, was sie als Neuroinhibitoren bzw.

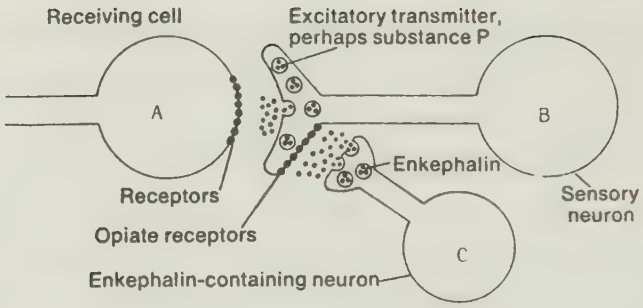


Abbildung 14: Darstellung einer Synapse zwischen zwei Nervenzellen A und B und der Modulatorzelle C.

Neuromodulatoren ausweist.

4.3 Die Struktur der Enkephaline

4.3.1 Semiempirische Konformationsenergieberechnungen

Die Tatsache, daß sowohl Enkephaline als auch Morphin dieselben Rezeptoren belegen, ließ Bradbury[52] vermuten, daß Morphin und Enkephalin gemeinsame Strukturmerkmale besitzen könnten. Der Vergleich von Modellen sowie

des C-Fragmentes von Lipotropin zeigt, daß die Tyrosinseitenkette des Enkephalins exakt mit der Orientierung des Phenolrings im Phenanthrengerüst des Morphins und der N-Terminus des Enkephalins mit der tertiären Aminfunktion korrespondiert. Die zwei Glycinreste besetzen in einem β-turn

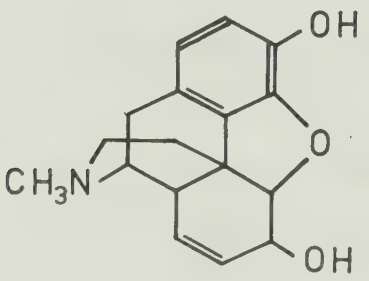


Abbildung 15: Struktur von Morphin

die Positionen 2 und 3 mit einer Wasserstoffbrücke zwischen der Carbonylgruppe des Tyrosins und der Aminogruppe des Phenylalanins. Das C-terminale Methionin liegt zwischen den aromatischen Seitenketten des Tyrosins bzw. des Phenylalanins.

Diesem Bradbury-Modell widerspricht eine Konformationsberechnung von de Coen[53], die basierend auf Kristallstrukturdaten von Aminosäuren[54] sowie energetischen Betrachtungen, zu dem Ergebnis kommt, daß im Energieminimum sowohl gefaltete als auch gestreckte Strukturen in einem Konfor-

mationsgleichgewicht vorliegen. Durch weitere mathematische Verfeinerung konnte ein Modell gefunden werden, das im Gegensatz zu Bradbury einen β_1-"Turn" mit Glycin in Position 3 und Phenylalanin in Position 4 als Zentrum besitzt.

Dieser Widerspruch veranlaßte Isogai[55] und Momany[56] unabhängig voneinander weitere Berechnungen der Konformationen von Enkephalin vorzunehmen. Mit Hilfe empirischer Potentialenergiefunktionen und Energieparameter, die Momany schon bei der Berechnung der Konformation des LH/FSH-"Releasinghormons" benutzte, kommen sowohl Isogai als auch Momany zu einem Strukturmodell, das sich nur dadurch un-

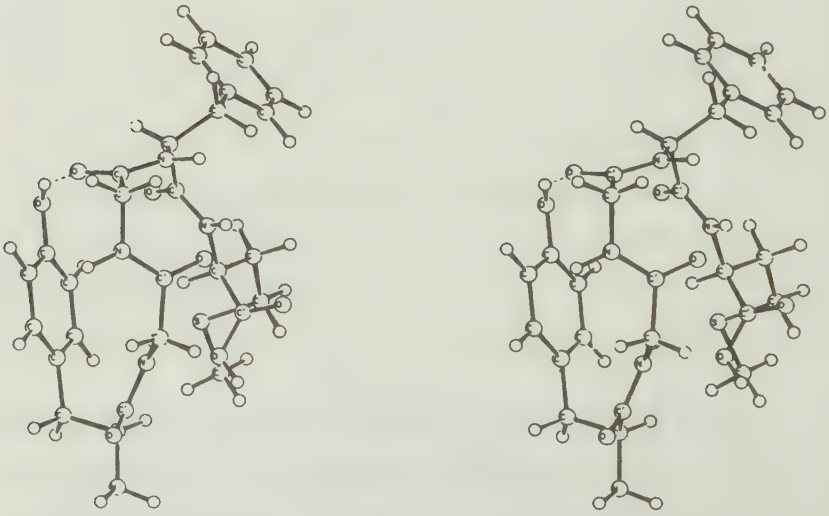


Abbildung 16: Stereoskopische Darstellung der niedrigsten Energiekonformation von Met-Enkephalin

terscheidet, daß die Dieder-Winkel etwas voneinander differieren. In der Konformation mit der niedrigsten Energie bildet die OH-Gruppe des Tyrosins eine starke Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe des Glycins in Position 3 mit einem H→O-Abstand von 1.69 Å. Außerdem enthält dieses Modell ein "β-bend" vom Lewis-Typ II[58], mit Glycin[3] und Phenylalanin[4] als Zentrum. Der Phenylalaninrest als auch der Methioninrest weisen in entgegengesetzte Richtung des Peptid-"Backbone". Da der Methioninrest praktisch nicht mit dem Restmolekül in Wechselwirkung tritt, war zu erwarten, daß der Austausch des Methionins gegen Leucin, im Leucin-Enkephalin ein ähnliches Energieprofil ergeben würde, was auch durch die Berechnungen von Isogai et al. bestätigt wurde.

Daß es aber auch Strukturgemeinsamkeiten zwischen so zwei verschiedenen Molekülen wie Met-Enkephalin und dem LH/FSH-"Releasing"-Hormon geben könnte, wurde zuerst von Momany[17] postuliert. Durch Vergleich der errechneten niedrigsten Energiekonformeren des Enkephalins und der LH/FSH-"Releasing"-Hormons kann eine verblüffende Ähnlichkeit festgestellt werden, was zur Vermutung führte, daß Enkephaline auch LH und FSH ausschütten könnten, was in Dosen von 3-100 µg/ml Medium in der Tat möglich ist.

In beiden Molekülen liegt der Tyrosinring unterhalb der Orientierung des Peptidgerüsts. Eine Ringseite ist dem Lösungsmittel

bzw. dem Rezeptor zugewandt. Der Phenylalaninrest des Enkephalins nimmt eine Position ein, die mit dem Histidin in Position 2 des LH/FSH-"Releasing"-Hormons adäquat ist. Der positiv geladene N-Terminus des Enkephalins ist im Raum so orientiert, daß er mit der Raumverteilung des positiv geladenen Argininrestes in Position 8 des Hormons in Einklang steht, während die N-terminale Pyroglutaminsäure des Hormons gut mit dem Ort des C-Terminus im Enkephalin korrespondiert.

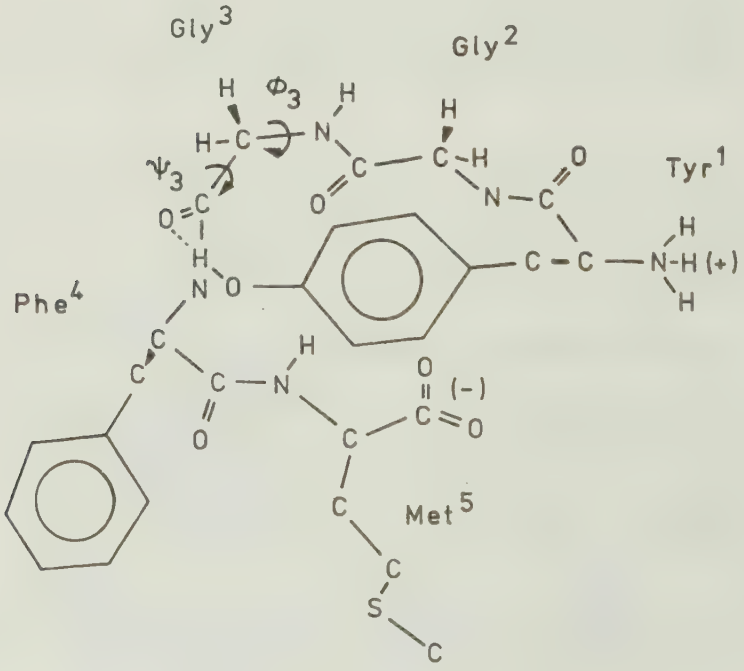


Abbildung 17: Konformation IA des Met-Enkephalins nach Momany[56]

4.3.2 Kernresonanzuntersuchungen der Enkephaline

4.3.2.1 ^{1}H-NMR-Untersuchungen

Bald nachdem genügend synthetisches Ausgangsmaterial verfügbar war, wurden die ersten Publikationen, die die Aufklärung der Struktur des Enkephalins durch ^{1}H-NMR-Spektroskopie zum Inhalt hatten, veröffentlicht. Sowohl die Arbeiten von Roques[59] und Jones[60] als auch diejenigen von Anteunis[61] und Bleich[62] kommen dabei zu ähnlichen Ergebnissen.

Roques konnte alle Signale des 300 MHz-Spektrums, gemessen in DMSO-d_6, zuordnen und durch Entkopplungsexperimente, die Kopplungskonstanten $^3J_{NH-\alpha CH}$ und $^3J_{\alpha CH-\beta CH}$, die über die Karplus-Bystrov-Kurven[23,63] die Torsionswinkel ϕ und ψ ergeben, ermitteln.

Die chemische Verschiebung des NH-Protons von Methionin in Abhängigkeit von der Temperatur, die auch von Jones beobachtet wird, deutet darauf hin, daß eine Wasserstoffbrücke vorliegt. Außerdem zeigen die Kopplungskonstanten nur kleine Abhängigkeiten der chemischen Verschiebung als Funktion der Temperatur, was für eine relativ stabile Konformation spricht. Auf der Basis dieser Ergebnisse, schlagen die Autoren eine Struktur vor, in der die Sequenz -Gly-Gly-Phe-Met- als"β_I-turn[58]"ausgebildet ist mit einer Wasserstoffbrücke zwischen dem NH des Methionins und der

Carbonylgruppe des Glycins in Position 2.

In dieser Konformation sind die beiden aromatischen Reste pseudoäquatorial und die Seitenkette von Methionin pseudoaxial zur Hauptebene des Peptid-"Backbone", d.h. die drei hydrophoben Seitenketten von Met, Tyr und Phe sind an der Peripherie des Pseudocyclus, der durch den "β_I-Turn" gebildet wird und die terminale Ammoniumgruppe kann sich der terminalen Carboxylgruppe nähern. Dieses Strukturmodell erklärt damit auch die Hydrophobizität des Met-Enkephalins (Löslichkeit in Wasser: <0.7 %) sowie seine Eigenschaft Lipid-enthaltende Membranen zu durchdringen.

Obwohl die Arbeitsgruppe von Jones einen "γ-Turn" innerhalb des Enkephalins ausschließt und ihre Messwerte ebenfalls am besten mit einem "β_I-Turn" in Einklang stehen, schliessen sie einen "β_{II}-Turn"nicht strikt aus.

Durch Doppelresonanz und Differenzdoppelresonanzexperimente konnte Jones auch die Rotamerenpopulationen der Seitenketten[24] berechnen. Die Seitenketten von Met, Phe und Tyr bevorzugen eine der beiden möglichen trans-gauche-Rotameren, haben aber auch in den anderen Rotameren signifikante Populationen. Die dominante trans-gauche-Population ist interessanterweise in guter Korrelation zur Topologie des "Tyraminrestes" innerhalb des Morphinmoleküls.

Im Gegensatz zu den Messungen von Roques, Jones, Anteunis und Bleich steht eine neuere Untersuchung von Higashijima[64]. Die Messungen des 270 MHz-Spektrums von Met-Enkephalin wurde in verschiedenen Lösungsmitteln vorgenommen. Aus den Daten für die dipolare Form des Moleküls, das in DMSO gemessen wurde, kann man eine beträchtliche Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der C_α-Protonen von der Konzentration als auch von der Temperatur feststellen, die Higashijima als einen Ringstromeffekt in molekularen Aggregaten interpretiert. Obwohl auch hier eine abnormale Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung des Amidprotons von Methionin gemessen wurde, sind die Autoren aufgrund ihrer Messung des Kern-Overhauser-Effekts[65] der Meinung, daß Met-Enkephalin in DMSO keinen β_I-turn bilden kann. Sie nehmen an, daß das Molekül in diesem Lösungsmittel in einem Gleichgewicht von gestreckten und gefalteten Konformationen steht und daß die gefalteten Konformationen durch gegenseitige Anziehung der positiv- bzw. negativ geladenen Termini, stabilisiert wird. Die Messung von zwitterionischem Met-Enkephalin in D_2O ergaben keine Anhaltspunkte für das Vorkommen von gefalteten Strukturen in diesem Lösungsmittel.

4.3.2.2 ^{13}C-NMR-Untersuchungen

Während Combrisson[66] für das Met-Enkephalin in DMSO/D_2O (50/50) nur die Zuordnung der Signale treffen konnte, konnte Stimson[67] für das Leu-Enkephalin durch Synthese von ^{13}C-

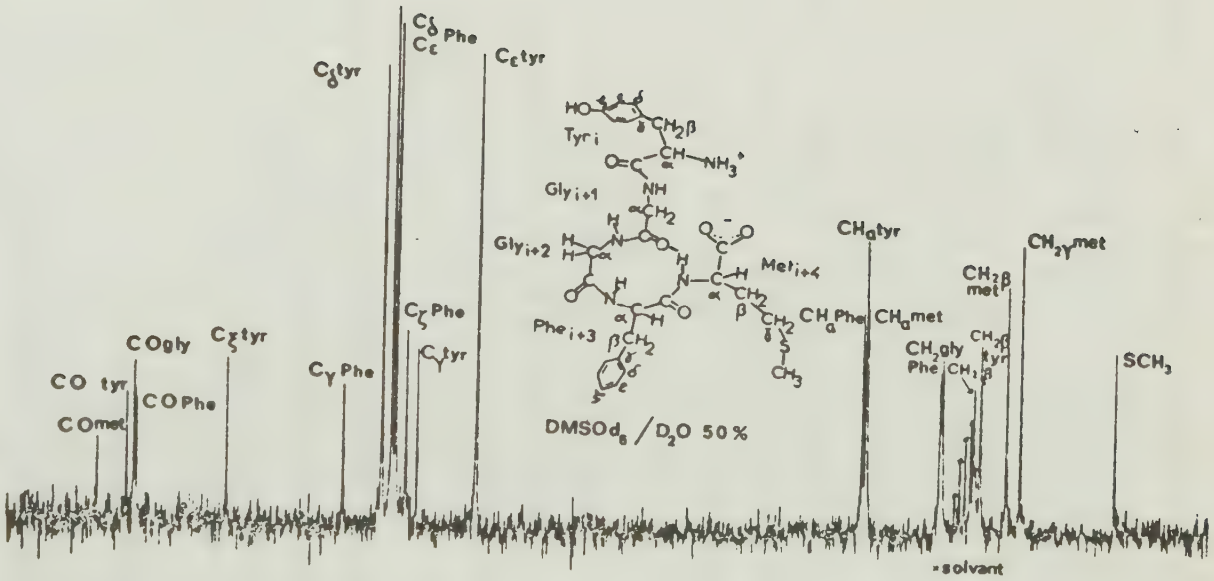


Abbildung 18: ^{13}C-NMR-Spektrum von Methionin-Enkephalin

angereichertem Leucin-Enkephalin durch Vermessung deselben auch Kopplungskonstanten und damit die Dieder-Winkel bestimmen.

Wie in der ^{1}H-NMR-Spektroskopie sind die chemischen Verschiebungen als auch die Kopplungskonstanten Sensoren für die vorhandenen Konformationen. Die $^{3}J_{^{13}C'-^{13}C'}$-Kopplungskonstanten ergeben einen Satz von Werten für die Dieder-Winkel Φ[68], wobei transständige Kohlenstoffatome eine große (> 3 Hz) und cisständige eine kleine Kopplungskonstante haben. Obwohl die $^{3}J_{^{13}C'-^{13}C'}$-Kopplungskonstanten nicht präzise bestimmbar sind, lassen sich über die $^{13}C'$-C^{α}-NH- und $^{13}C'$-N-C^{α}-^{1}H-Kohlenstoff-Wasserstoff-Spin-Wechselwirkungen[69] zusätzliche Informationen über den Torsionswinkel Φ gewinnen. Durch Vergleich mit der in der ^{1}H-NMR-Spektroskopie üblichen Beziehung für die $^{3}J_{CH-NH}$-Kopplungskonstanten ist es möglich, ein Strukturmodell zu erstellen. Auskunft über die Verteilung der Rotameren der Seitenketten geben die Kopplungskonstanten $^{3}J_{C^{\alpha}H-C^{\beta}H}$.

Informationen über die intramolekularen Wasserstoffbrücken erhält man durch Messung der Temperaturabhängigkeit der CO- bzw. NH-Resonanzen. Nach Kopple[26,70] gilt, daß NH-Gruppen, die an intramolekularen Wasserstoffbrücken beteiligt sind, niedrigere Temperaturkoeffizienten besitzen als jene, die mit dem Lösungsmittel in Wechselwirkung stehen.

Durch Korrelation des niedrigsten NH-Temperaturkoeffizienten mit dem niedrigsten der CO-Werte, postuliert Stimmson für das Leu-Enkephalin eine Wasserstoffbrücke zwischen dem NH- des Leucins udn dem CO des Glycins in Position 2; solch eine Wasserstoffbrücke impliziert gleichzeitig einen "β-Turn", der an Gly^3-Phe^4 zentriert ist. Die Werte der Temperaturkoeffizienten und die Werte der Kopplungskonstanten und damit der Winkel Φ und ψ lassen einen "β-Turn" vom Lewis-Typ I[58] folgern, in dem die Gly^3-NH-, die Gly^3-CO- und die Phe^4-CO-Gruppen vom "β-Turn" aus nach außen zeigen, während die Phe^4-NH-Gruppe leicht in den "β-Turn" geneigt ist. Dies steht in Gegensatz zu den theoretischen Berechnungen von Bradbury[52] als auch zu den Ergebnissen der Röntgenstrukturanalyse von Smith[79].

Die Seitenkettenkonformationen werden durch die Winkel ψ bestimmt. Sie sind über die ^{1}H-Kopplungskonstanten $C^{\alpha}H$-C^{β} oder über die ^{13}C-$C^{\beta}H$-Kopplungskonstanten zugänglich. Während die Methode von Pachler[24] für die ^{1}H-Kopplungskonstanten nur die Unterscheidung zwischen gauche- und trans Konformeren zuläßt, lassen sich die beiden t_g- bzw. g_t-Rotameren mit Hilfe der ^{13}C- $C^{\beta}H$-Konstanten unterscheiden. Nach Wehrli et al.[71] hat nur die sogenannte g^+_t-Konformation (Nomenklatur: Flory, Biochemistry 9, 3471 (1970)) ein transständiges $C^{\beta}H$-Proton zum Carbonylkohlenstoff! Dies führt zu einer großen Kopplungskonstanten (> 8 Hz), während die Kopplungskonstanten von gauche-Protonen zu kleinen Kopplungskonstanten (1-2 Hz) führt. Wenn die drei möglichen

chen "staggered"-Konformationen um die $^{13}C\text{-}C^{\beta}H$-Achse gleichwahrscheinlich oder wenn die Rotation um die Achse frei ist, wird ein Mittelwert von ∿ 4.3 Hz erwartet[72].

Die Messungen für Leu-Enkephalin ergeben im Falle des Tyrosins die Kopplungskonstante $^{3}J_{C^{\alpha}\text{-}C^{\beta}H}$ = 8 Hz und 4.7 Hz; dies indiziert eine Dominanz der t_g (oder g_t) Rotameren; die ^{13}C-Kopplungskonstanten ($^{3}J^{13}_{C\text{-}C^{\beta}H}$ = 1.0 und 2.7 Hz) sprechen eindeutig für das Vorhandensein des t_g^- - Rotameren. Aus den Bystrov-Karplus-Kurven läßt sich entnehmen, daß die Kopplungskonstanten zu den Winkeln ψ von -60 oder -90° gehören. Bei dem Phenylalanin- bzw. Leucinrest überwiegt ebenfalls die t_g^--Konformation. Daß die Tyrosinseitenkette in ihrer Rotation behindert ist, steht in Übereinstimmung mit den Messungen von Bleich[62] für das Met-Enkephalin; die behinderte Rotation für Phenylalanin und Leucin allerdings stehen in Kontrast zu den Messungen von Bleich und Jones[60], die signifikante Populationen für etliche Rotamere für Phe und Leu postulieren.

4.3.4 Ramanspektrum von Leucin-Enkephalin

Durch Vergleich der Laser-Ramanspektren von kristallinem Leu-Enkephalin mit den Lösungsspektren in H_2O, D_2O und DMSO konnte Han[73], die Informationen über die die Konformation bestimmenden Amid I- und Amid III-Banden erhalten. Die Amid I-Bande, die hauptsächlich durch die Carbonylstreckschwingung verursacht wird, beobachtet man in Peptiden zwischen 1600 - 1700 cm^{-1}.

Die Amid III-Bande, die hauptsächlich durch die C-N-Streckschwingung verursacht wird, enthält noch Anteile der NH-"in plane bending"-Schwingung. Sie erscheint bei 1230-1350 cm^{-1}.

Durch Vergleich der Spektren des Leu-Enkephalins in H_2O und D_2O kann die Amid I-Bande als eine breite Bande zwischen 1630-1700 cm^{-1} mit dem Zentrum bei 1657 cm^{-1}, die Amid III-Bande bei 1248 cm^{-1} lokalisiert werden. Dies steht in Einklang mit den Werten, die für ungeordnete Strukturen in Polypeptiden gemessen wurden[74,75].

Daß Leu-Enkephalin in Wasser in einer Vielzahl von Konformationen vorliegt, wird auch durch das Fehlen einer Amid III-Bande zwischen 1290 und 1330 cm^{-1}, die das Vorhandensein einer β-bend-Struktur[76,77] indizieren würde, bestätigt. Das Intensitätsverhältnis der Doppelbande, die bei 851 bzw. 826 cm^{-1} auftritt, ist ein Indikator für eventuell auftretende Wasserstoffbrückenbeteiligung von phenolischen OH-Gruppen[78]. Das Verhältnis von 1.05 indiziert, daß im Falle des Leu-Enkephalins, die phenolische OH-Gruppe des Tyrosins nicht an einer intramolekularen H-Brücke beteiligt ist, sondern starke Wechselwirkungen mit den umgebenden Wassermolekülen eingeht.

Die Amid I- bzw. Amid III-Bande für die Messungen in DMSO liegen bei 1691 bzw. 1340 cm^{-1}. Durch Schwingungsanalyse der anderen auftretenden Banden, wurde auf das

Vorhandensein einer "β-bend"-Struktur geschlossen, deren Typ aber nicht genau determiniert wurde.

In kristallinem Zustand wurden eine intensive Bande bei 1674 cm^{-1} und eine schwächere bei 1642 cm^{-1} der Amid I-Bande, sowie Banden bei 1255, 1271, 1282 und 1325 cm^{-1} der Amid III-Bande zugeordnet. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit den berechneten Werten von Bandekar und Krimm[76] für eine Struktur mit "β_I-bend".

4.3.5 CD-Spektren von Methionin-Enkephalin

Die CD-Messungen von Spirtes in Wasser in Abhängigkeit vom pH-Wert, sowie in Trifluorethanol zeigen keinen Anhaltspunkt dafür, daß das Hydroxylproton des Tyrosins an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist. Da bei der Messung der Spektren in Abhängigkeit von der Temperatur ebenfalls eine nennenswerten Effekte zu beobachten waren, schloß Spirtes, daß Met-Enkephalin in Wasser in einem Konformerengleichgewicht vorliegt.

4.3.6 Röntgenstrukturanalyse von Leucin-Enkephalin

Nachdem es gelungen war, aus wässrigem Methanol Einkristalle zu züchten, war es möglich, eine Röntgenstrukturanalyse durchzuführen. Die von Smith[79] erhaltenen Werte ergeben die Struktur des Leu-Enkephalins wie in Abbildung 19 zu sehen ist. Der Phenolring des Tyrosins

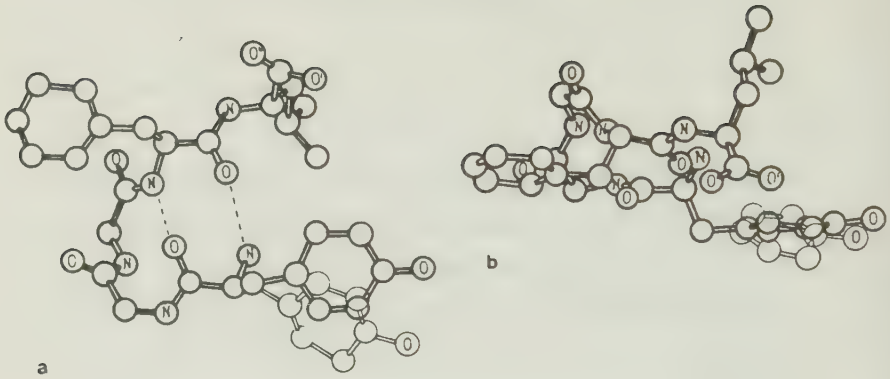


Abbildung 19: Stereoskopische Darstellung der Kristallstruktur von Leucin-Enkephalin.

setzt zwei diskrete Positionen. Alle Peptidbindungen sind in trans-Konfiguration. Zwei intramolekulare Wasserstoffbrükken bilden einen "β-Turn" in der Sequenz Tyr-Gly-Gly-Phe. Diese Brücken sind zwischen dem Aminostickstoff des Tyrosins und dem Carbonylsauerstoff des Phenylalanins, sowie zwischen dem Aminostickstoff des Phenylalanins und dem Carbonylsauerstoff des Tyrosins lokalisiert. Die Carbonylgruppen der beiden Glycinreste zeigen in entgegengesetzte Richtung des internen "Bends" des Moleküls.

Die innere Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff des Tyrosins und dem Amidstickstoff des Phenylalanins als auch der "β-Turn" wurden schon von Bradburry[52]

vorhergesagt. Die zweite Wasserstoffbrücke konnte aber weder durch die oben abgehandelten theoretischen Berechnungen noch durch die NMR-Messungen lokalisiert werden, was nicht bedeutet, daß in Lösung, wo ganz andere Bedingungen herrschen, zwei Wasserstoffbrücken existieren.

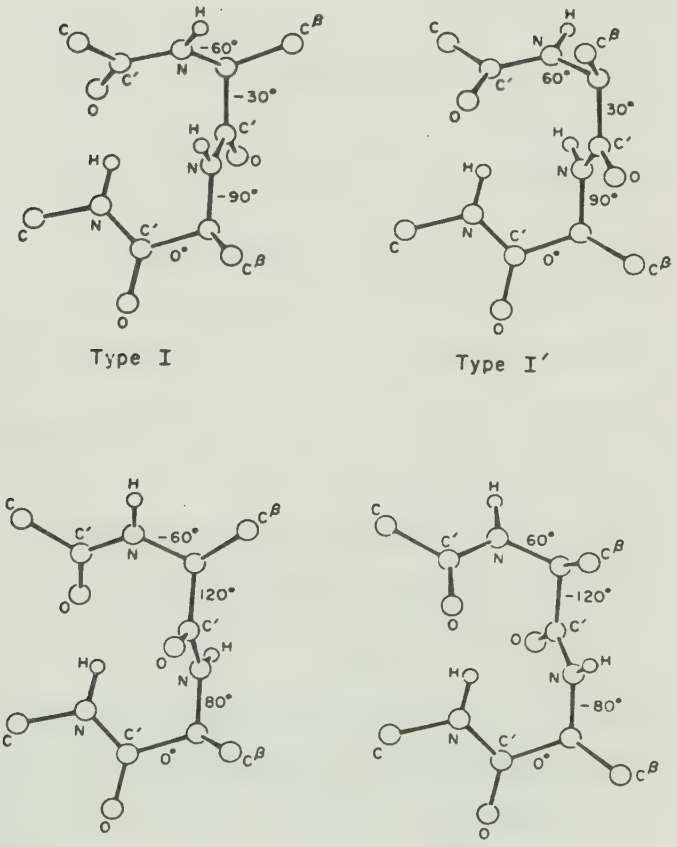


Abbildung 20: Verschiedene Arten von β-bends.

4.4 Struktur-Aktivitätsbeziehungen

Strukturmodifikationen zum Zwecke der Änderung der Wirkungsweise von Regulatorpeptiden werden in einer solchen Vielzahl vorgenommen, daß hier nur kurz darauf eingegangen werden kann. Dem Peptidchemiker stehen im Prinzip drei Möglichkeiten zur Abwandlung zur Verfügung:

1.) Veränderunggen in der Kettenlänge.

2.) Modifikationen der Seitenketten.

3.) Veränderung des "Peptid-Backbone" durch:

a) Konfigurationswechsel: Austausch von L- gegen D-Aminosäuren,

b) Austausch von L-Aminosäuren gegen Azaaminosäuren (α-CH ersetzt durch N),

c) Austausch von L-Aminosäuren gegen N-methylierte Reste (CO-NH ersetzt durch CO-NMe),

d) Umkehr der Peptidbindung (CO-NH ersetzt durch NH-CO), Retropeptide,

e) Austausch von Kohlenstoffatomen oder im Falle des Cysteins, Austausch von Disulfidbrücken (CO-NH ersetzt durch CH_2-CO, CH_2-NH, CH_2-CH_2 oder CH=CH, S-S ersetzt durch CH_2-S oder CH_2-CH_2),

f) Verwendung von Thiomethylenanalogen (CO ersetzt durch CH_2-S),

g) Austausch von α-Aminosäuren gegen β- oder γ-Aminosäuren (Einschub von CH_2-Gruppen),

h) Bildung von Depsipeptiden (NH ersetzt durch O) oder

i) Veränderungen der α-Aminogruppe der L-Aminosäure, z.B. durch Hydrazino- (NH ersetzt durch NH-NH), Aminoxy- (NH ersetzt durch NHO) und N-Amino-(NH ersetzt durch $N(NH_2)$) Gruppen.

Durch die obengenannten Veränderungen am LH/FSH-"Releasing"-Hormon erhält man agonistische oder antagonistische Verbindungen. Dies führte zu fertilitätsregulierenden Verbindungen in der Arzneimittelforschung- Behandlung der weiblichen Sterilität mit Agonisten des LH/FSH-"Releasing"-Hormons führt durch vermehrte Ausschüttung von Gonadotropinen zu vermehrter Ovulation, während Antagonisten contrazeptive Wirkung haben. Dies könnte zu einer "Antibabypille" auf Peptidbasis führen, welche jene auf Steroidbasis in Zukunft ablösen könnte.

Welche Positionen innerhalb des Moleküls für solche Veränderungen entscheidend sind, ist aus Abbildung 21 ersichtlich.

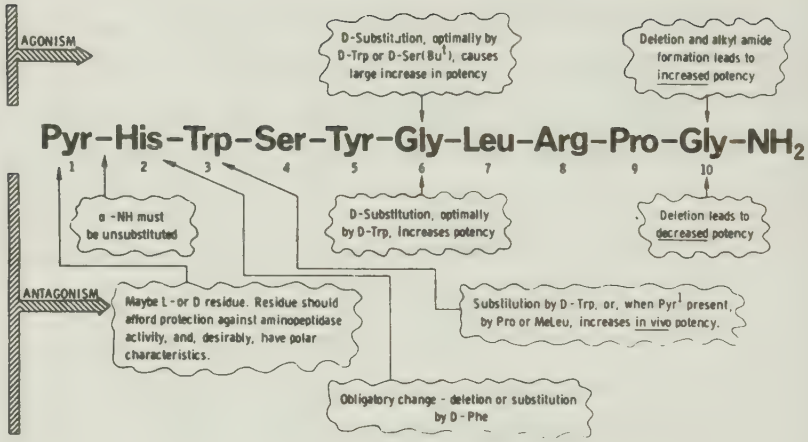


Abbildung 21: Modifikationen am LH/FSH-"Releasing"-Hormon

1.) Agonisten sind erhältlich:

a) Durch Austausch des Glycinrestes in Position 6 des Moleküls gegen D-Aminosäurereste[80,81,82]. Besonders aromatische D-Aminosäuren wie z.B. D-Tryptophan ergeben einen starken Anstieg der biologischen Aktivität, wobei als grobe Regel für andere in Position 6 substituierte Analoge gilt: D-Tyr > D-Phe > D-Arg > D-Lys > D-Ala > D-Leu > D-Met.

b) Austausch des C-terminalen Fragments -Pro-Gly-NH_2

gegen Pro^9-NH-Alkyl führt für Ethyl- als Alkylrest zu einer fünffachen Steigerung der biologischen Aktivität, während der Trifluoroethylrest eine neunfache Steigerung herbeiführt[83].

c) durch Austausch sowohl des Glycinrestes in Position 6 gegen D-Aminosäurereste als auch Veränderung des C-terminalen Endes führt zu den potentesten Agonisten, wie z.B. (D-Ala^6, des-Gly^{10})-LH-RH-ethylamid.

2.) Antagonisten sind erhältlich:

a) Durch Austausch des Histidinrestes in Position 2[84,85] gegen den D-Phenylalaninrest oder durch Entfernen des Histidins[86].

b) Durch Austausch des Histidin- und Tryptophanrestes[85] oder Entfernen des Tryptophanrestes.

c) Durch Austausch des Pyroglutaminsäurerestes[87,88]

d) Durch gemeinsame Veränderung der Positionen 1,2,3 und 6; dies führt, basierend auf der Sequenz (Aminosäurerest^1, D-Phe^2, D-Trp^3, D-Trp^6)-LH-RH, zu den potentesten Inhibitoren.

Über Struktur-Aktivitätsbeziehungen innerhalb der Enkephaline ist, obwohl in der Zwischenzeit schon etwa 1000 ana-

loge Verbindungen synthetisiert wurden, relativ wenig zu sagen; über Antagonisten ist so gut wie nichts bekannt.

Für Leucin-Enkephalin ist die Position 2 sehr wichtig für die biologische Aktivität. Ersetzt man den Glycin- gegen den Serinrest erhält man ein Enkephalin[89,90], das fünffach potenter ist als das natürliche Leucin-Enkephalin. Durch Substitution des Glycins gegen einen D-Aminosäurerest kommt man zu folgender Reihenfolge der Aktivität: D-Ala > D-Thr > D-Met > D-Phe > D-Leu > D-Asp.

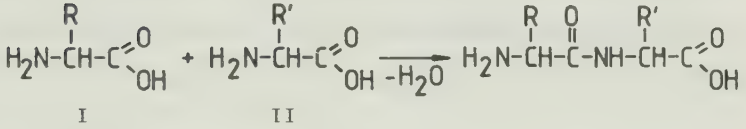
Obwohl die Position 2 in Met-Enkephalin hinsichlich der biologischen Aktivität nicht so stark empfindlich gegen Veränderungen zu sein scheint, konnte durch Synthese des ($D\text{-}Ala^2$)-Met-Enkephalins gezeigt werden, daß eine Substitution in Position 2, eine Steigerung der Aktivität, während ein Austausch des Glycins in Position 3 gegen D-Ala[91], einen Abfall der Aktivität bewirkt. Dies wird dadurch erklärt, daß D-Aminosäuren den in der Struktur vorhandenen "β-bend" stabilisieren können, als auch damit, daß das Molekül gegen den Angriff von Proteasen geschützt ist. Gleichzeitige Veränderung der Position 2 durch D-Alanin und Änderung des C-Terminus führen zu einem starken Anstieg der biologischen Aktivität. Als Beispiele seien das ($D\text{-}Ala^2$)-Met-Enkephalinamid[92] sowie das das Morphin um mehrere Zehnerpotenzen

übertreffende Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-NH-$(CH_2)_2$-N(O)Me_2, genannt. Auch eine einfache Kettenverlängerung des Met-Enkephalins um die Aminosäurereste Arginin und Phenylalanin, läßt die Aktivität ansteigen[93].

5. Peptidsynthesen

5.1 Ziel der Peptidsynthese

Ziel jeder Peptidsynthese ist es, die Aminogruppe einer Aminosäure durch eine zweite Aminosäure zu acylieren; d.h. es wird unter Wasseraustritt eine Amidbindung geknüpft und zwar unter Erhalt der optischen Aktivität.



I II

Grundvoraussetzung für diese Acylierungsreaktion ist, das Carboxylkohlenstoffatom der Aminosäure I genügend zu aktivieren, um dann nucleophil von der Aminogruppe der Aminosäure II angegriffen zu werden. Eine Übersicht über die Vielzahl der Aktivierungsmethoden gibt der Houben-Weyl-Band 15/2, herausgegeben von E. Wünsch, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1974.

Da aber jede Aminosäure mindestens eine Carboxyl- und eine Aminogruppe enthält, kann eine Aminosäure sowohl den acylierenden (sog. Carboxylkomponente), als auch den zu acylierenden (sog. Aminokomponente) Reaktionspartner darstellen und als solche auch an der Peptidknüpfungsreaktion teilnehmen. Dies gibt, zumal es eine ganze Reihe von Aminosäuren gibt, die Seitenkettenfunktionen mit gleicher oder höherer Reaktivität als die Aminogruppe besitzen, Anlaß zu Nebenreaktionen während der Peptidbindungsreaktion.

Um definierte Peptide zu synthetisieren, ist es deshalb notwendig, alle funktionellen Gruppen, die während der Synthese Anlaß zu unerwünschten Reaktionen geben, durch Einführung von intermediären oder konstanten Schutzgruppen zu blockieren.

Diese allgemeinen Schwierigkeiten haben zur Entwicklung einer Vielzahl von Amino- und Carboxy- sowie Seitenkettenschutzgruppen geführt, deren optimale Kombination und Anwendungsmöglichkeiten in der Literatur ausführlich referiert sind[94,95,96].

5.2 Begründung und Zielstellung des Themas

Die Aussicht auf Verwendung der Releasinghormone als Diagnostika als auch als Therapeutika sowie die geringe Ver-

fügbarkeit an biologischem Material, stellt dem Peptidchemiker die Aufgabe, diese Peptide in möglichst reiner Form und in guten Ausbeuten zu synthetisieren.

Von dem therapeutischen Einsatz des LH/FSH-"Releasing"-Hormons erhofft man sich Erfolge bei der Behandlung von Ammenorhoe, Pubertas tarda, Kryotorchismus als auch bei gewissen Sterilitätsursachen.

In folge des schnellen enzymatischen Abbaus (Halbwertszeiten von 4-8 Minuten) die das LH/FSH-"Releasing"-Hormon im Kreislauf erfährt, wird in dieser Arbeit versucht, die Effektivität dieser Substanz durch Modifikation seiner Molokülstruktur zu erhöhen. Außerdem sollen die Substanzen dazu dienen, das Postulat von Momany, daß die biologische Aktivität diese Hormons entscheidend vom Abstand des Histidins vom Arginin bestimmt wird, zu überprüfen.

Aus der Literatur ist zudem bekannt[282], daß die enzymatische Inaktivierung durch eine schnelle Spaltung der Glycin-Leucin-Bindung sowie einer langsamen Abspaltung des C-terminalen Dipetids Pro-Gly-NH_2 verursacht wird.

Um diese Effekte auszuschalten bzw. das Momany-Postulat zu überprüfen, sollen erstmalig β- bzw. γ-Aminosäuren in die relevanten Positionen 1, 6 und 10 eingebaut werden.

Ebenfalls von großem Interesse sind aber auch Analoga mit antagonistischer Wirkung, die kompetitiv den Effekt des endogenen LH-RH und damit die Gonadotropinsekretion hemmen und als nicht-steroidale Kontrazeptiva oder bei der Behandlung der Pubertas praecox eingesetzt werden könnten.

Wie im vorigen Kapitel erwähnt, kann man u.a. durch Austausch des Histidins gegen D-Phenylalanin zu solchen antagonistisch wirksamen Substanzen kommen; zusätzlich werden aus den oben erwähnten Gründen in diese Hormonanaloga ebenfalls β-Aminosäuren eingebaut.

Da aber die Synthese von biologisch aktiven Peptiden nach der von B. Merrifield[98] entwickelten Methode der Festphasensynthese oft zu schwierig abtrennbaren Nebenprodukten (Rumpf- und Fehlsequenzen) führt[284-288], sollen in dieser Arbeit, die LH/FSH-"Releasing"-Hormone mit Hilfe der "klassischen Peptidsynthese" aufgebaut werden.

Die zu synthetisierenden Decapeptidamide beinhalten bis auf die Aminosäuren Glycin, Leucin und Prolin alle Drittfunktionen, die zu schützen sind. Außerdem kommt es am N-terminalen Teil des Moleküls zu einer Anhäufung von Aminosäuren, die peptidchemisch als problematisch gelten. Aus diesen Gründen wird mit maximalem Schutz unter Verwendung der Fragmentverknüpfungstechnik gearbeitet; dabei werden die Fragmente so ausgewählt, daß die Schnittstellen nicht mit denen aus der Li-

teratur bekannten Synthesen entsprechen.

Die nach diesen neuen Synthesestrategien herzustellenden Fragmente werden vergleichend mit Hilfe der als relativ racemisierungssicher geltenden Methoden der DCCI/HOBt, DPPA- und der gemischten Anhydridmethode gekuppelt.

Das Problem, die Guanidinoseitenkette des Arginins, das ja auch Bestandteil des LH/FSH-"Releasing"-Hormons ist, ausreichend zu schützen, so daß einerseits die Basizität der Guanidinogruppe ausgeschaltet wird, andererseits die Schutzgruppe wieder unter milden Bedingungen abspaltbar ist, ist so alt wie die Peptidchemie. Milde Abspaltungsbedingungen sind bei der Synthese des LH/FSH-"Releasing"-Hormons von ganz besonderem Interesse, da das Molekül die besonders labile Aminosäure Tryptophan beinhaltet.

Auf die in früheren Synthesen oft verwendete N^{ω}-Nitromaskierung wird hier verzichtet, da diese Schutzgruppe sowohl bei der Kupplung (innermolekulare Lactambildung) als auch bei der Abspaltung, die nur unter drastischen Bedingungen durchführbar ist, Nebenreaktionen verursacht[289,290,291,292]. Außerdem kommt es bei der Ammonolyse von Nitroargininhaltigen Peptiden zu Ornithin-haltigen Nebenprodukten[293].

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wird im ersten Teil der Arbeit die p-Methoxybenzolsulfonylgruppe als Guanidinoschutz verwendet, da mit dieser Schutzgruppe in der Diplomarbeit

schon gute Erfahrungen gemacht wurden. Obwohl diese Schutzgruppe beträchtliche Vorteile besitzt, wird versucht eine neue Schutzgruppe auf Sulfonamidbasis zu entwickeln, die die leicht abzusehenden Schwierigkeiten noch besser bewältigen läßt, d.h. , die unter acidolytischen Bedingungen abspaltbar ist, andererseits auch als Schutzgruppe für die Drittfunktionen der basischen Aminosäuren Lysin, Ornithin und Histidin verwendbar ist. Auf diesen Verwendungszweck geprüft werden die 2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl- als auch die m-Trifluormethylbenzolsulfonylgruppe. Als Testpeptide für die neue 2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonylgruppe sollen ein LH/FSH-"Releasing"-Hormon-Analoges mit mittelständigem Arginin sowie das Tetrapeptid Tuftsin mit C-terminalem Arginin dienen.

Eine äußerst interessante Feststellung war, daß zwei so verschiedene Peptide wie LH/FSH-"Releasing"-Hormon und das opioide Peptid Enkephalin Strukturgemeinsamkeiten haben, die wie im vorigen Kapitel erwähnt, zuerst von Momany[17,56] auf Grund von Konformationsenergieberechnungen erkannt wurde. So konnte Bowers[281,282] zeigen, daß Met^5-, Leu^5- sowie $D\text{-}Phe^2$, Met^5-Enkephalinamid in Dosen von 3-100 µg/ml Medium LH/FSH-ausschüttende -, während Met^5-, Leu^5- und $DOPA^1$-Enkephalin LH/FSH-inhibierende Wirkung haben.

Die Tatsache, daß es auch hier Agonisten und Antagonisten für das LH/FSH-RH gibt, war Anlaß, nach neuen Synthesewegen

für die schwierig zu synthetisierenden Enkephaline zu suchen. Außerdem soll durch klassische Peptidsynthese zum erstem Mal das {Arg^6,Phe^7}-Met-Enkephalin synthetisiert werden. Hierbei sollte ebenfalls die neue Arginin-Schutzgruppe zum Einsatz kommen.

Peptidkupplungen müssen racemisierungssicher sein. Die Forderung wird durch die DCCI/HOBt- bzw. DCCI/HOSu-Kupplungstechnik weitgehend erfüllt obwohl beide Techniken nicht frei von Nebenreaktionen ablaufen. Ein weiterer Nachteil ist die Länge der Reaktionszeit dieser Kupplungen. Um diese Nachteile zu eliminieren, wurden in letzter Zeit auf der Basis von Acylphosphonium- bzw. Tetraalkyluroniumverbindungen[169,180] neue Verknüpfungsreagenzien entwickelt. Die Nachteile dieser Verbindungen liegen, obwohl eine Peptidkupplung in kurzer Zeit durchgeführt werden kann, in ihrer relativ hohen Racemisierungsanfälligkeit. Um diesen Nachteil auszuschalten, wird versucht, den bei diesen Verbindungen als Racemisierungssuppresor eingesetzten HOBt-Rest durch andere die Racemisierung unterdrückende Reste zu ersetzen.

Diese neuen Reagenzien sollen an Teilsequenzen des LH/FSH-"Releasing"-Hormons und am oft verwendeten Modellpeptid Z-Val-Gly-OMe auf ihre Verwendbarkeit und Ausbeute getestet werden und anschließend bei der Synthese verschiedener Enkephalinderivate eingesetzt werden.

5.3 Synthese des LH/FSH-"Releasing"-Hormons

Von den etwa 2000 Analoga des LH/FSH-Releasinghormons, die bis heute synthetisiert wurden, wurde der weitaus größte Teil durch Festphasensynthesen hergestellt. Die Literatur berichtet über nur wenige klassische Synthesen[99-109].

Dies mag seinen Grund darin haben, daß in diesem Decapeptidamid die Sequenz 1-5 nur Aminosäuren trifunktioneller Natur beinhaltet, die allesamt als schwierig gelten, außerdem steht in Position 8 die Aminosäure Arginin, deren Einbau in Peptide noch immer große Probleme mit sich bringt.

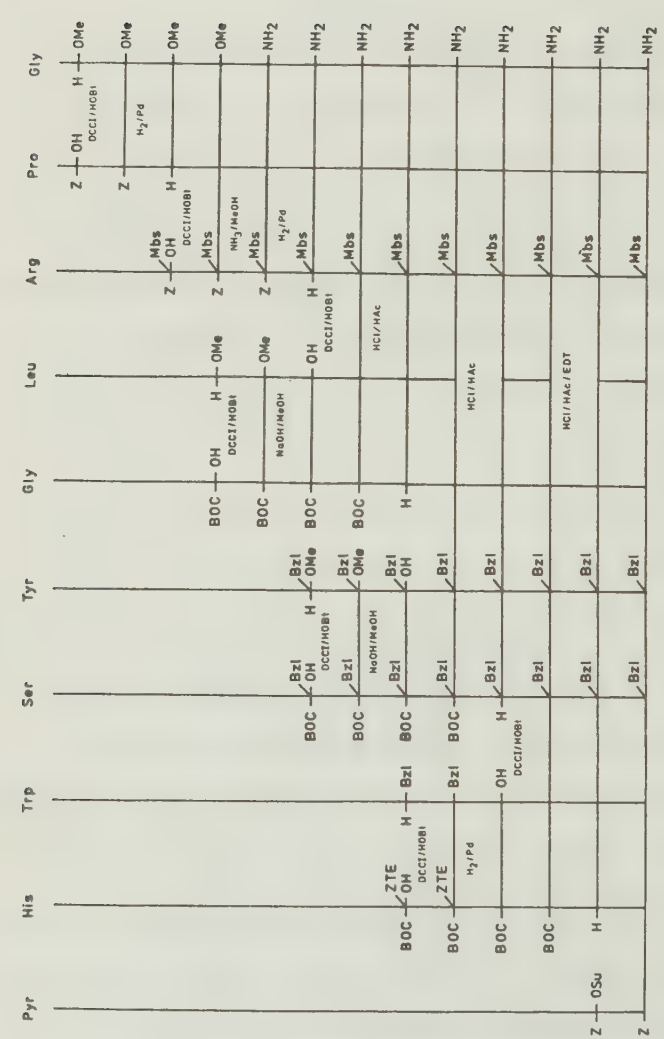
Bei der Synthese des natürlichen Hormons wurde deshalb wie folgt vorgegangen:

Der Schutz der intermediären Aminofunktionen wurde wegen der bequemen Handhabung durch die tert.-Butyloxycarbonyl-(BOC-) bzw. Benzyloxycarbonyl-(Z-)-Schutzgruppe vorgenommen.
Die c-terminalen Carboxylfunktionen wurden durch Methylierung oder Benzylierung in die Ester überführt.
Da acidolytische Abspaltung der Aminoschutzgruppen vom Tryptophanrest stets zu Komplikationen wie z.B. tert.-Butylierung[110] bei Verwendung der BOC-Schutzgruppe führt, wurden die Abspaltungen unter Stickstoffatmosphäre in Gegenwart eines Kationenfängers wie Mercaptoethanol[111] bzw.

Ethandithiol und oder Anisol[112] vorgenommen.

Der Schutz der OH-Funktionen des Serins bzw. Tyrosins durch den sowohl hydrogenolytisch als auch acidolytisch abspaltbaren Benzylrest[113-115] hat sich in diesem Falle als beste präperative Methode erwiesen. Die Guanidinogruppe des Arginins wird durch die p-Methoxybenzolsulfonylgruppe[116], die in vorhergegangenen Synthesen gute Dienste geleistet hat[117], geschützt. Die quantitative Abspaltung dieser Schutzgruppe kann entweder durch Methan- bzw. Trifluormethansulfonsäure oder durch flüssigen Fluorwasserstoff erfolgen. Der Verlauf der Synthesen wurde durch ^{13}C-NMR-Spektroskopie kontrolliert.

Aus dem Syntheseschema 1 ist ersichtlich, wie die einzelnen Fragmente synthetisiert wurden. Ausgangspunkt der Synthese ist der C-Terminus, beginnend mit der Synthese des Dipeptids Z-Pro-Gly-OMe, das leicht und in guten Ausbeuten entweder durch eine Dicyclohexylcarbodiimid-Kupplung oder aber auch durch Mischanhydrid- oder Diphenylphosphorazidat-Kupplung zugänglich ist. Nach Entfernen der Z-Schutzgruppe mit Wasserstoff (Katalysator: Palladium/Aktivkohle) wird das Dipeptid H-Pro-Gly-OMe mit Z-Arg(Mbs)-OH zum Tripeptid gekuppelt. Ammonolyse in Methanol bei 0^{o} C überführt den Tripeptidester in das gewünschte Tripeptidamid. Alternativ wird auch das Dipeptid Z-Pro-Gly-OMe mit Ammoniak



Syntheseschema 1: Synthese des nativen LH/FSH-"Releasing"-Hormons

in das Dipeptidamid überführt, die Z-Schutzgruppe entfernt und mit Z-Arg(Mbs)-OH gekuppelt. Die Ausbeuten und die Reinheit der Peptide beider Synthesewege sind in ungefähr gleich groß.

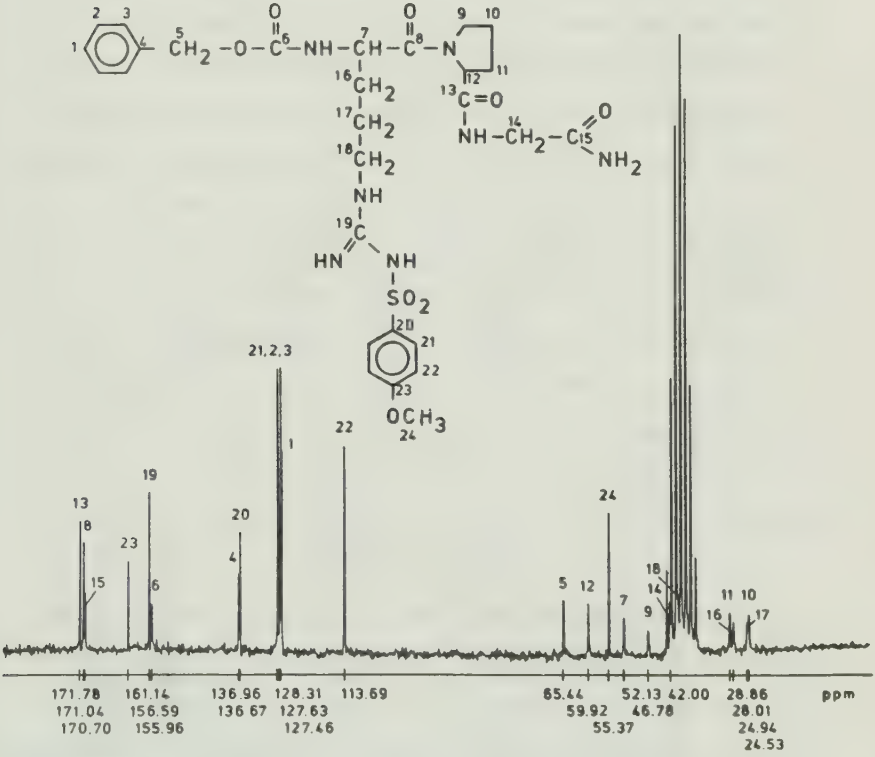


Abbildung 22: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2; protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 310 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 18592 Pulsinterferogramme

Synthese des Dipeptids BOC-Gly-Leu-OH durch Kupplung von BOC-Glycin mit Leucinmethylester und anschließender Verseifung ergibt die Kupplungskomponente, die mit dem von der Z-Schutzgruppe befreiten Tripeptid H-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2 als Aminokomponente in einer DCCI/HOBt-Kupplung den aliphatischen Pentapeptidteil des Hormons zugänglich macht. Das Dipeptid BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH wird in sehr guten Ausbeuten aus BOC-Ser(Bzl)-OH und O-Benzyltyrosinmethylester ebenfalls in einer DCCI/HOBt-Kupplung gewonnen.

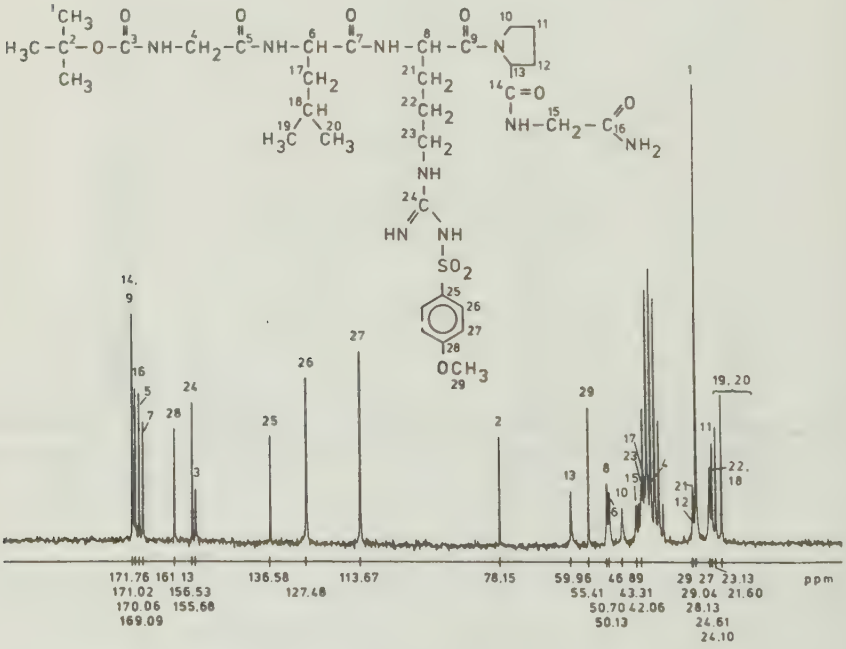


Abb. 23: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2; 200 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 10 000 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

Nach Verseifung und Kupplung mit dem durch Chlorwasserstoff/Essigsäure entacylierten Pentapeptidamid H-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2 erhält man das Heptapeptidamid BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2. Um das Tryptophan in Position 3 des Hormons so schonend als möglich in den Peptidverband einzuführen, wird dessen Benzylester gewählt, der mit dem Histidinderivat BOC-N^{im}-(1-Benzyloxycarbonylamino-2,2,2-trifluoroethyl)-histidin gekuppelt wird. Dieses Derivat, mit der von Weygand[118] gefundenen Imidazolschutzgruppe, wurde deshalb gewählt, weil durch die Aminoacetalisierung der NH-Funktion die Basizität des Imidazolringes weitgehend erniedrigt ist, dadurch wird die Löslichkeit der Histidinpeptide in Wasser stark herabgesetzt, außerdem ist die N^{im}-(1-Benzyloxycarbonylamino-2,2,2-trifluoroethyl)-Schutzgruppe unter den Bedingungen der alkalischen Esterhydrolyse sowie unter den acidolytischen Abspaltungsbedingungen für die BOC-Schutzgruppe stabil. Der Nachteil dieser Imidazolschutzgruppe ist das Vorhandensein eines Diastereomerengemisches durch das zusätzliche Asymmetriezentrum, was die Charakterisierung der Peptide durch Drehwerte und Schmelzpunkte wenig sinnvoll macht.

Nach erfolgter Kupplung erhält man das Dipeptid BOC-His(ZTE)-Trp-OBzl, das in einer Hydrierung mit Wasserstoff in Gegenwart von Palladium/Aktivkohle sowohl von der ZTE- als auch von der Benzylestergruppierung befreit wird. Die

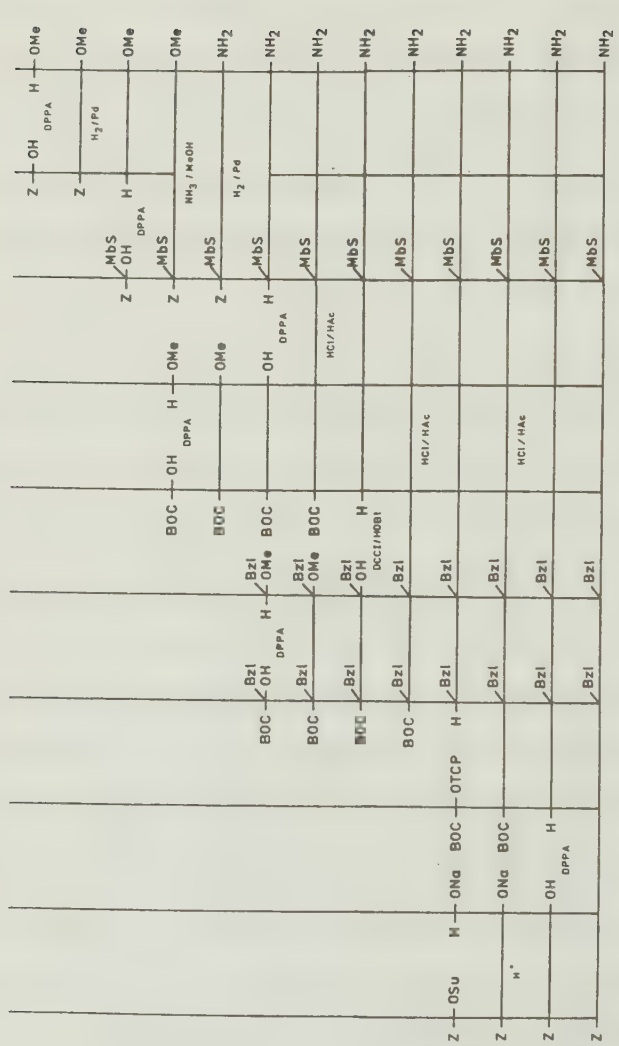
Kupplung von BOC-His-Trp-OH mit dem entacylierten Heptapeptidamid ergibt das geschützte Nonapeptidamid BOC-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2. Wegen der unter acidolytischen Bedingungen in Gegenwart von Sauerstoff möglichen Zerstörung des Indolsystems des Tryptophans wird die Entfernung der BOC-Schutzgruppe mit Hilfe von Chlorwasserstoff in Essigsäure unter Stickstoff in Gegenwart von Ethandithiol als Kationenfänger durchgeführt. Das geschützte Decapeptid schließlich wird durch Kupplung mit dem N-Hydroxysuccinimidester der Pyroglutaminsäure erhalten. Die Abspaltung aller verbliebenen Schutzgruppen wird mit der Sakakibara-Methode[115] in flüssigem Fluorwasserstoff vorgenommen. Nach Entfernen des Fluorwasserstofes wird der Rückstand in 0.1 N Essigsäure augenommen und mit DOWEX 1X4-Ionenaustauscher (Acetatform) behandelt und dann gefriergetrocknet.

Das lyophilisierte Rohprodukt wird durch Verteilungschromatographie an Sephadex G 15 im Laufmittelsystem n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5), Oberphase, [99], sowie durch Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose gereinigt. Das soerhaltene Produkt zeigt alle physikalischen und chemischen Eigenschaften wie die in der Literatur beschriebenen.

5.4 Synthese des Decapeptidamids Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-β-Ala-NH_2

Das LH/FSH-"Releasing"-Hormonanalog mit verändertem C-Terminus wird in ähnlicher Weise durch Fragmentkupplungen wie das oben besprochene native Hormon synthetisiert. Die DCCI/HOBt-Kupplungen werden aber hier weitgehend durch Diphenylphosphorazidat-Kupplungen ersetzt. Diese Kupplungsmethode wurde von Shioiri[119,120] erfolgreich zur Synthese verschiedener Peptide verwendet; sie zeichnet sich durch ihre Schnelligkeit und ihre weitgehende Racemisierungssicherheit aus.

Der Aufbau des Decapeptidamids erfolgt so, daß zuerst das C-terminale Dipeptid Z-Pro-β-Ala-OMe synthetisiert wird. Diese Strategie ist notwendig, da die Direktsynthese des geschützten Dipeptidamids Z-Pro-β-Ala-NH_2 oder alternativ BOC-Pro-β-Ala-NH_2 nur in sehr schlechten Ausbeuten möglich ist. Nach hyrogenolytischer Abspaltung der Z-Schutzgruppe, wird mit Z-Arg(Mbs)-OH gekuppelt und anschließend mit Ammoniak in Methanol in das Tripeptidamid Z-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2 überführt. Das zweite Fragment BOC-Gly-Leu-OH wird analog der Synthese des nativen Hormons durchgeführt und mit dem entacylierten Tripeptidamid mit DPPA in Dimethylformamid gekuppelt. Nach Entfernen der BOC-Schutzgruppe mit Chlorwasserstoff/Essigsäure, wird nach der Strategie 2 +5 mit BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH , das ebenfalls durch DPPA-Kupplung aus den Komponenten BOC-Ser(Bzl)-OH und H-Tyr(Bzl)-OMe gewonnen und nach erfolgter Kupplung mit Natronlauge in Dioxan verseift wird, zum geschützten Heptapeptidamid verlängert.



Syntheseschema 2: Synthese des (β-Ala^{10})-"Releasing"-Hormons

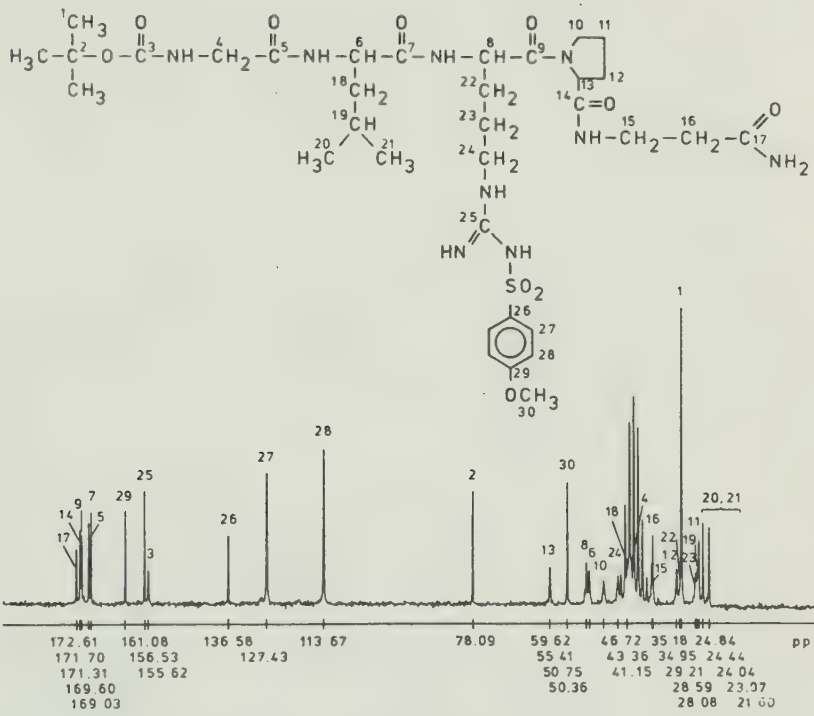
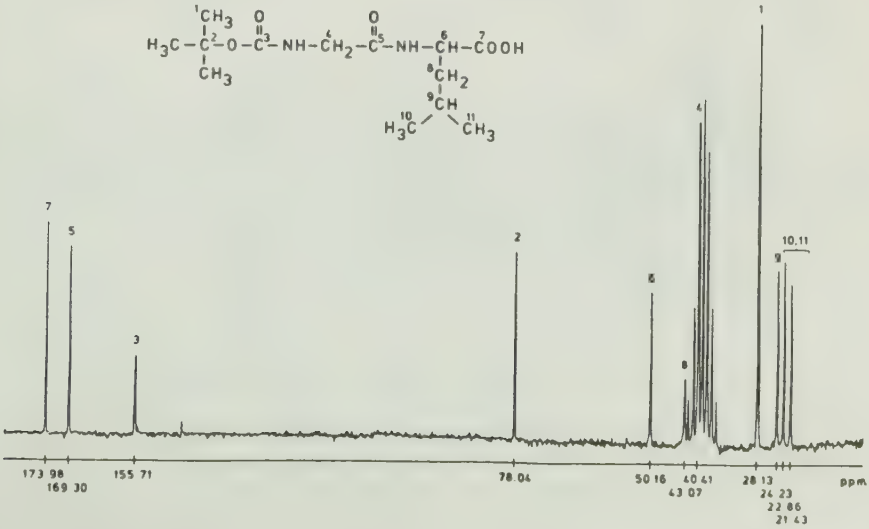


Abb.: 24 und 25



Nach Deblockierung der aminoendständigen BOC-Gruppe erfolgt die Einführung des Tryptophans über eine Aktivesterkupplung mit BOC-Tryptophan-2,4,5-trichlorphenylester. Das so zugängliche Octapeptid wird unter Zusatz

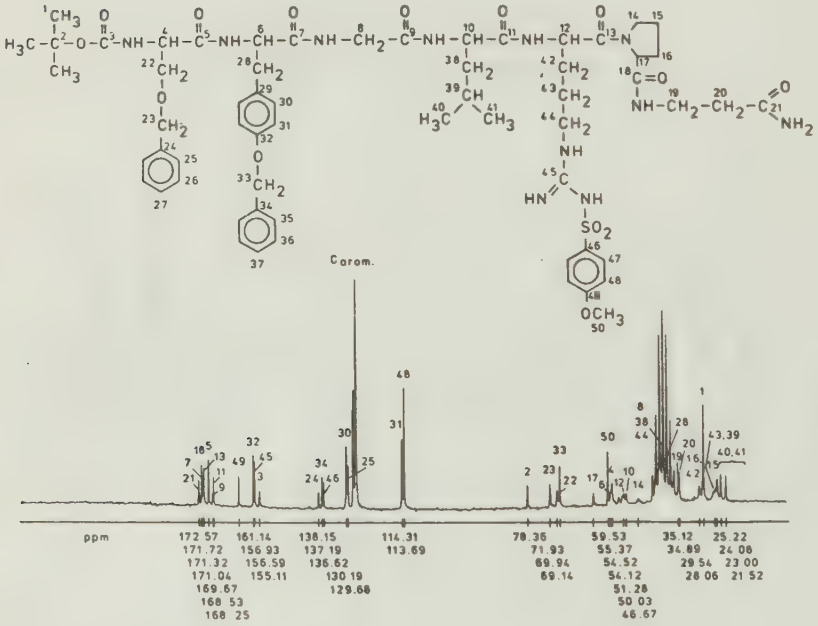


Abb.26: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2, 220 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 68184 Pulsinterferogramme, 2o. 115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

von Ethandithiol mit Chlorwasserstoff/Essigsäure von der Schutzgruppe befreit und mit dem nach Kurath[121] bei der Synthese des TRH-Releasinghormons verwendeten Dipeptid Z-Pyr-His-OH, das durch Kupplung von Z-Pyr-N-Hydroxysuccinimidester mit dem Natriumsalz des Histidins zugänglich ist, in einer DPPA-Kupplung zum geschützten Decapeptidamid gekuppelt. Sämtliche verbliebenen Schutzgruppen werden durch eine Abspaltung in flüssigem Fluorwasserstoff entfernt. Das so gewonnene Rohprodukt wird analog der für das native Hormon beschriebenen Prozedur gereinigt.

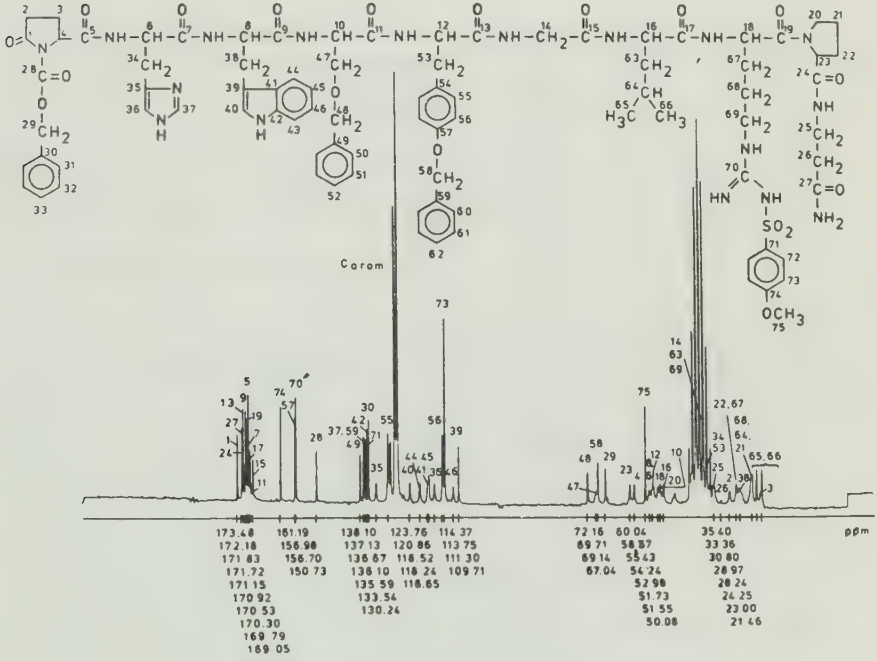
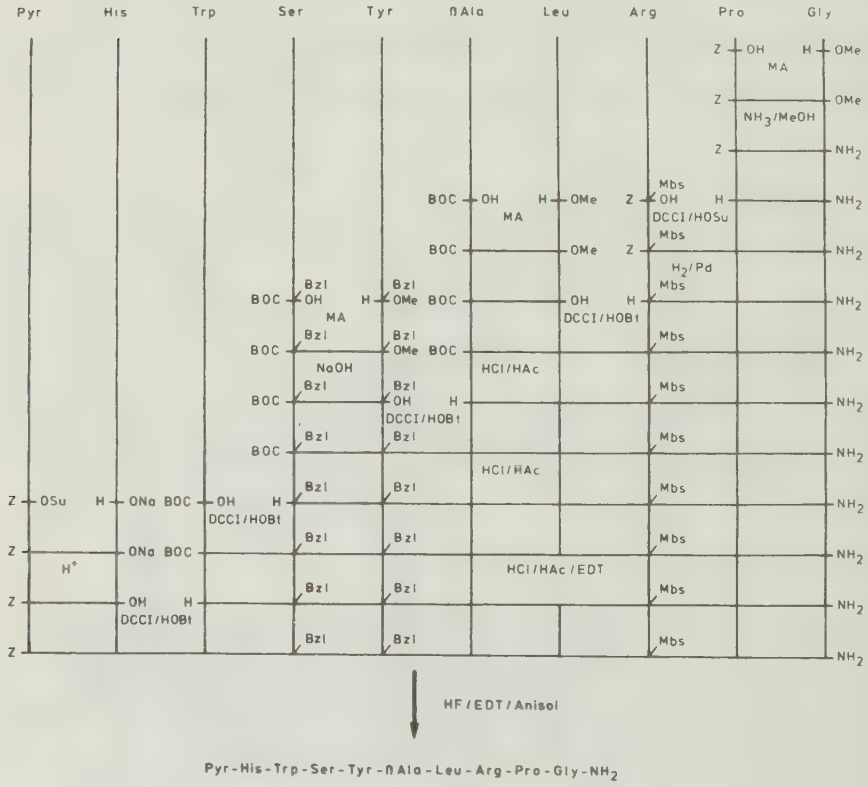


Abb. 27: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Pyr-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2, 79 050 Pulsinterferogramme, 200 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 20.115 MHz

5.5 Synthese des Decapeptidamids Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-β-Ala-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2

Der Austausch des Glycinrestes in Position 6 des LH/FSH-"Releasing"-Hormons durch die glycinhomologe Aminosäure β-Alanin separiert den aliphatischen C-terminalen Teil des Moleküls vom aromatischen N-Terminus durch Ein-



Syntheseschema 3: Synthese des (β-Ala^6)-LH/FSH-"Releasing"-Hormons"

schub einer zusätzlichen Methylengruppe. Die Synthese dieses, eine β-Aminosäure beinhaltenden Analogen, lehnt sich eng an die bei den vorigen Synthesen gemachten Erfahrungen an.

Als Kupplungsmethode für die Dipeptidfragmente wird hier allerdings das sogenannte Mischanhydrid-Verfahren , das nahezu gleichzeitig von Wieland[122], Boissonas[123] und Vaughan[124] in die Peptidchemie eingeführt wurde, verwendet. Hierbei wird ein N-Acylaminosäuresalz einer tertiären Base mit einem O-Alkyl-kohlensäurechlorid in einem indifferenten Lösungsmittel bei tiefen Temperaturen umgesetzt. Das gebildete Anhydrid, das nicht isoliert wird, reagiert dann mit der Aminokomponente, wobei der bei der Reaktion gebildete Kohlensäuremonoester sofort unter Bildung von Kohlendioxid und dem entsprechenden Alkohol zerfällt; dadurch lassen sich die Peptide in einfacher Art und Weise isolieren.

Nach dieser Methode wird zuerst wieder das Dipeptid Z-Pro-Gly-OMe synthetisiert; nach Abspaltung der Z-Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung, erfolgt eine DCCI/N-Hydroxysuccinimid-Kupplung mit Z-Arg(Mbs)-OH. Das Fragment BOC-β-Ala-Leu-OMe wird nach erfolgter Mischanhydridkupplung mit 0.1 N Natriumhydroxid in Methanol verseift und mit dem zuvor in das Amid überführte und anschließend Z-deblockierte Tripeptid mit Hilfe einer DCCI/HOBt-Kupp-

lung in das gewünschte Pentapeptidamid überführt. Nachdem die BOC-Schutzgruppe mit Chlorwasserstoff/Essigsäure entfernt wurde, konnte mit BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH zum Heptapeptid verlängert werden. BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH wird ebenfalls mit der Mischanhydrid-Methode synthetisiert und anschließend verseift. Das Octapeptid wird durch DCCI/HOBt-Kupplung von BOC-Tryptophan mit dem von dem BOC-Gruppe befreiten Heptapeptid gewonnen.

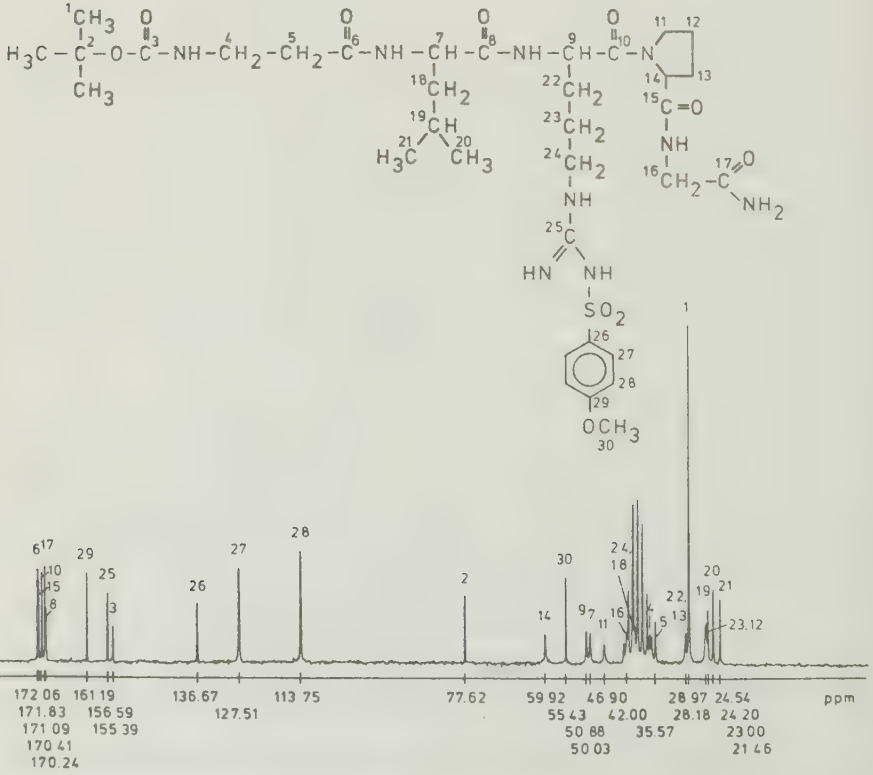


Abb. 28: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2, 210 mg, 30 936 Pulsinterferogramme, 20.115

Dieses Octapeptid läßt sich praktisch ohne Nebenreaktionen deblockieren. Das geschützte Decapeptidamid wird durch Kupplung mit Z-Pyr-His-OH erhalten. Die Abspaltung der Schutzgruppe und die Reinigung des soerhaltenen Rohpeptids wird in analoger Weise wie bei den vorhergegangenen Synthesen vorgenommen.

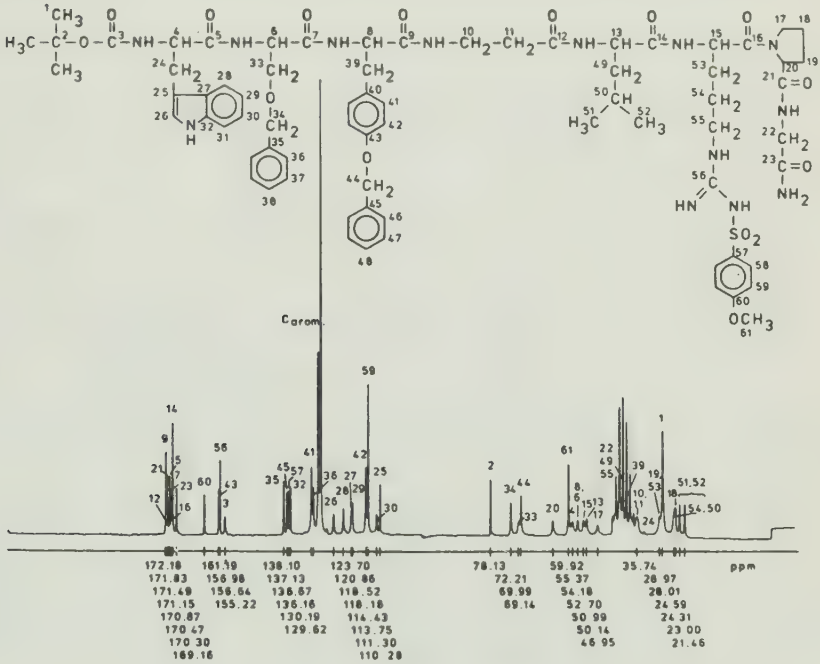
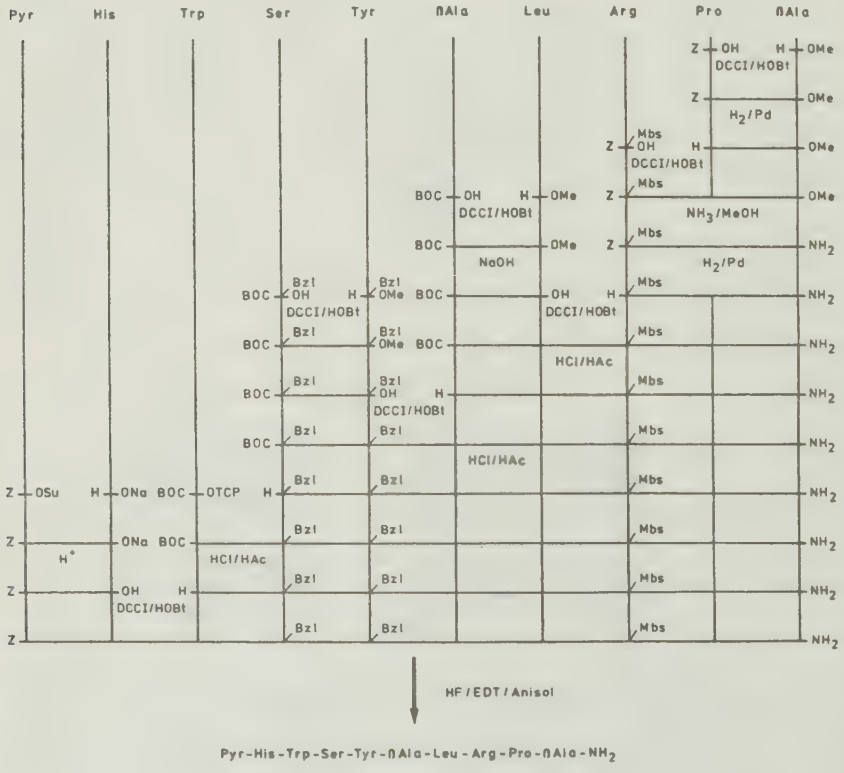


Abb. 29: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2, 225 mg in DMSO-d_6, 44 000 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, Protonenbreitbandentkoppelt

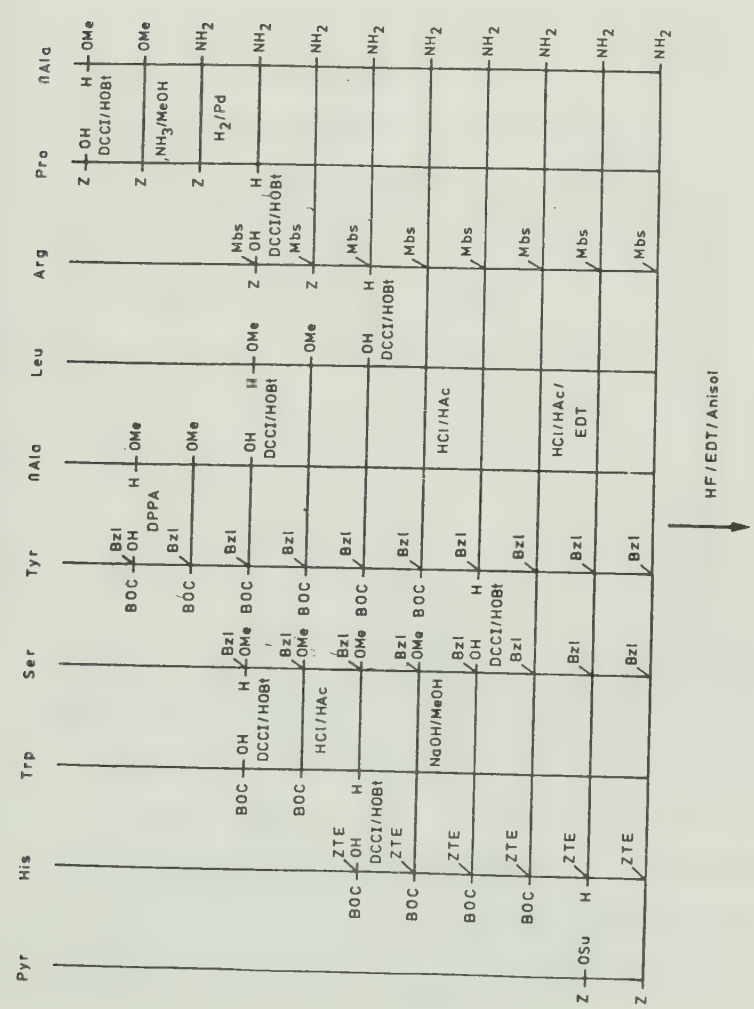
5.6 Synthese des Decapeptidamids Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-β-Ala-Leu-Arg-Pro-β-Ala-NH_2

Weitere Konformationsfreiheitsgrade sollte das LH/FSH-"Releasing"-Hormon gewinnen, wenn man sowohl das Glycin in Position 6 als auch jenes in Position 10 durch β-Alanin ersetzt. Es werden für dieses Peptid zwei vonein-



Syntheseschema 4: Synthese des (β-Ala^6, β-$Ala\text{-}NH_2{}^{10}$)-LH/FSH-"Releasing"-Hormons

ander unabhängige Synthesewege beschritten, wobei sich der erstere, wie aus dem Syntheseschema zu entnehmen ist, eng an die bei den vorhergegangenen Synthesen verwendete



Syntheseschema 5: Alternative Synthese des (β-Ala^6, β-Ala-NH_2^{10})-LH/FSH-"Releasing"-Hormons

Aufteilung der Fragmente anlehnt. Die zweite Synthese, die wie die erste, fast ausschließlich die DCCI/HOBt-Kupplungsmethode benützt, hat ihren Ausgangspunkt ebenfalls am C-Terminus.

Durch Kupplung von Z-Pro-OH mit β-Alaninmethylester erhält man Z-Pro-β-Ala-OMe, das im Gegensatz zu den obigen Synthesen, direkt mit Ammoniak in Methanol in das Dipeptidamid überführt wird, durch Deblockierung mit Wasserstoff (Katalysator: Palladium/Aktivkohle) unter gleichzeitiger Titration mit 0.1 N HCl erhält man das Dipeptidamid als Hydrochlorid. Dieses wird mit dem bewährten Z-Arg(Mbs)-OH zum geschützten Tripeptid gekuppelt, wobei zu bemerken ist, daß diese Variante eine etwas schlechtere Ausbeute als die z.B. in der ersten und zweiten Synthese verwendete ergibt. Der Mittelteil des Hormonanalogen wird wie folgt synthetisiert: Kupplung von BOC-Tyr(Bzl)-OH mit β-Alaninmethylester unter DPPA-Bedingungen ergibt das Dipeptid BOC-Tyr(Bzl)-β-Ala-OMe, das nach Verseifung und anschließender DCCI/HOBt-Kupplung mit Leucinmethylester den geschützten Tripeptidester BOC-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-OMe in guten Ausbeuten zugänglich macht. Das gewünschte Hexapeptidamid wird nach Verseifung der Carboxylkomponente und Entacylierung der Aminokomponente durch Kupplung der beiden Tripeptide erhalten. Die Abspaltung der BOC-Gruppe erfolgt durch Behandlung mit Chlorwasserstoff/Essigsäure. Das Tripeptid 2-4 wird durch Kupplung

von BOC-Tryptophan mit Ser(Bzl)-OMe, anschließender Abspaltung der BOC-Schutzgruppe und Verknüpfung mit BOC-His(ZTE)-OH sowie Verseifung des erhaltenen Tripeptidesters synthetisiert. Das Nonapeptidamid erhält man durch Kupplung des Tripeptids 2-4 als Carboxylkomponente mit dem Hexapeptid 5-10. Das Decapeptid wird nach Entfernen der BOC-Schutzgruppe durch Aktivesterkupplung mit Z-Pyr-N-Hydroxsuccinimidester als Carboxylkomponente erhalten,

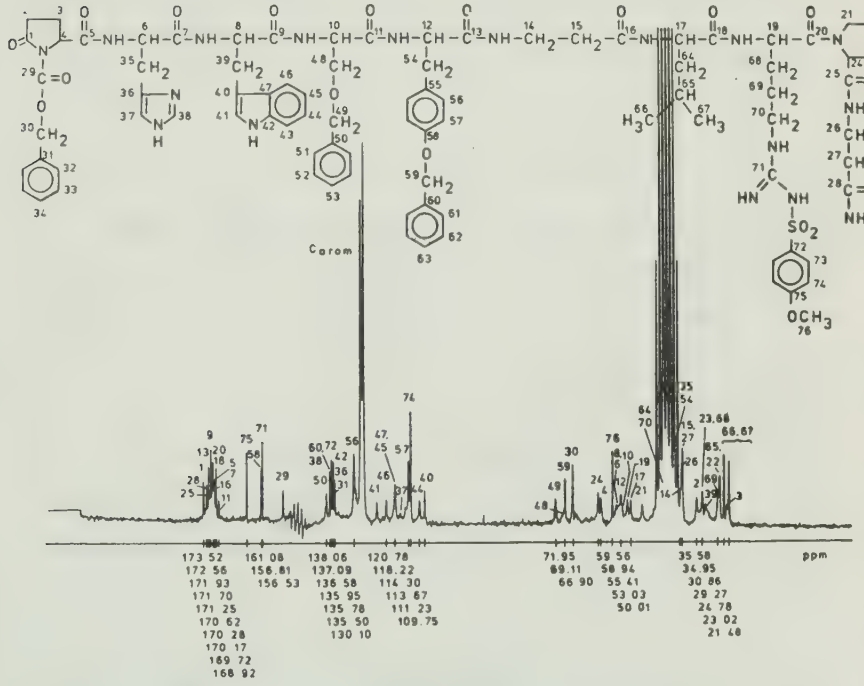


Abb. 30: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Pyr-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2, 200 mg in DMSO-d_6, 128 000 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz

das wie üblich mit flüssigem Fluorwasserstoff unter Zusatz von Kationenfängern von sämtlichen Schutzgruppen befreit wird. Die Reinigung erfolgt durch Verteilungschromatographie an Sephadex G 15 mit der Oberphase des Laufmittelsystems n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) nachdem die Säule mit der Unterphase äquilibriert wurde. Ein analysenreines Produkt wird durch Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose mit einem Ammoniumacetatgradienten von 0.01 -0.3 M (pH 4.8 - 7.0) erhalten. Die erhaltenen Peptide der ersten und zweiten Strategie sind in allen physikalisch-chemischen Parametern identisch.

Vergleicht man die beiden Synthesewege, die zu dem LH/FSH-Releasinghormonanalogen Decapeptid geführt haben, so ist die erstere Variante, aufgrund der besseren Strategie vorzuziehen, obwohl sich beide, was die Ausbeute anbetrifft, kaum unterscheiden. Die erstgenannte Strategie vermeidet die mehrfach angewandten Verseifungen, außerdem wird das säurelabile Tryptophan nicht so oft einer acidolytischen Prozedur ausgesetzt. Dies wird auch bei den folgenden Syntheseplanungen stets mitberücksichtigt.

5.6.1 Synthese des Decapeptidamids Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-h-Pro-Gly-NH_2

Um Struktur-Aktivitätsbeziehungen von Peptidhormonen zu

studieren, wurden in Ermangelung geeigneter Homoprolinsynthesen, immer wieder Pipecolinsäure in die Peptide eingebaut. Erst durch die Entwicklung geeigneter Verfahren zur Darstellung der S-Pyrrolinessigsäure durch Balaspiri[125], Wakabayashi[126] sowie Cassal[127] konnte zum erstenmal diese β-Aminosäure in ein Peptid eingebaut werden.[125] Die Synthese des hier verwendeten Homoprolins, das das natürliche L-Prolin in Position 9 des LH/FSH-Releasinghormons substituieren soll, wird nach der Cassal-Methode durch Homologisierung von Z-Prolin nach Arndt-Eistert hergestellt.

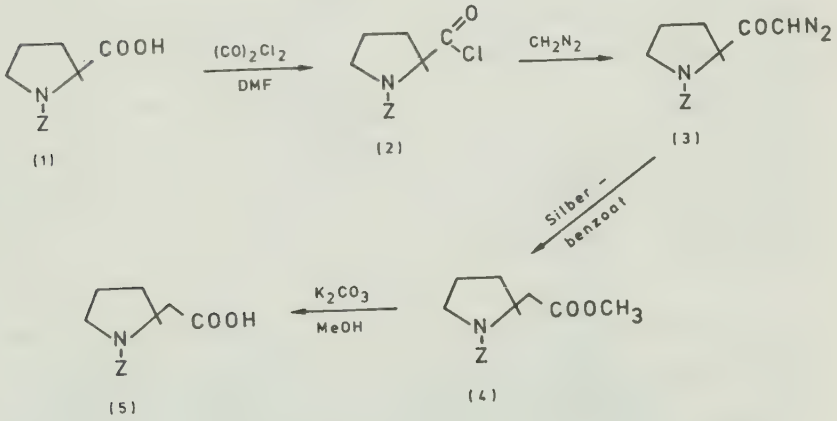


Abb. 31: Synthese von Z-homo-Prolin

Z-Prolin (1) wird nach dem Verfahren von Bosshard[128] mit Oxalylchlorid in Gegenwart katalytischer Mengen Dimethylformamid in das Säurechlorid (2) überführt. Durch Umsetzen des so erhaltenen Z-Pro-Cl mit Diazomethan erhält man in 75 %iger Ausbeute das kristalline Diazoketon (3), neben wenig Z-Prolinmethylester, der durch Umkristallisation entfernt wird. Dieser S-2-Diazoacetyl-1-pyrrolidincarbonsäurebenzylester wird in einer thermischen Wolff-Umlagerung mit Silberbenzoat und Triäthylamin in den Z-Homoprolinmethylester umgelagert. Daß diese Wolff-Umlagerung stereospezifisch unter Retension der Konfiguration abläuft, wurde von Cassal[127] mit Hilfe der ^{1}H-NMR-Spektroskopie-Methode unter Zuhilfenahme von Tris(3-(heptafluor-n-propyl-hyroxymethylen-(+)-campherato)-Europium als Shiftreagenz nachgewiesen. Die gemessenen Drehwerte entsprechen denen von Cassal. Durch Verseifung mit Kalium-Carbonat in einem Methanol/Wasser-Gemisch erhält man das Z-Homoprolin als kupplungsfähige Komponente.

Durch DCCI/HOBt-Kupplung mit Glycinmethylester erhält man den Z-geschützten Dipeptidester in guten Ausbeuten. Die Deblockierung erfolgt wie üblich durch Hydrogenolyse mit Palladium/Aktivkohle als Katalysator. Das so gewonnene Öl wird mit Z-Arg(Mbs)-OH zum Tripeptid gekuppelt und durch Ammonolyse in Methanol in das Amid überführt. Das schon oben abgehandelte Dipeptid BOC-Gly-Leu-OH wird nach Abhydrieren der Z-Gruppe des Tripeptidamids mit demselben

zum Pentapeptid BOC-Gly-Leu-Arg(Mbs)-hPro-Gly-NH_2 verknüpft. Die Entfernung der BOC-Gruppe wird durch Rühren des Peptids in 1.2 N Chlorwasserstoff in Essigsäure vorgenommen. Zur weiteren Kettenverlängerung dient das Fragment BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH das durch DCCI/HOBt-Kupplung und anschließender Verseifung gewonnen wird. Das Heptapeptid wird in üblicher Weise entacyliert und mit BOC-Tryptophan-2,4,5-trichlorphenylester in einer Aktivesterkupplung zum geschützten Octapeptidamid verlängert.

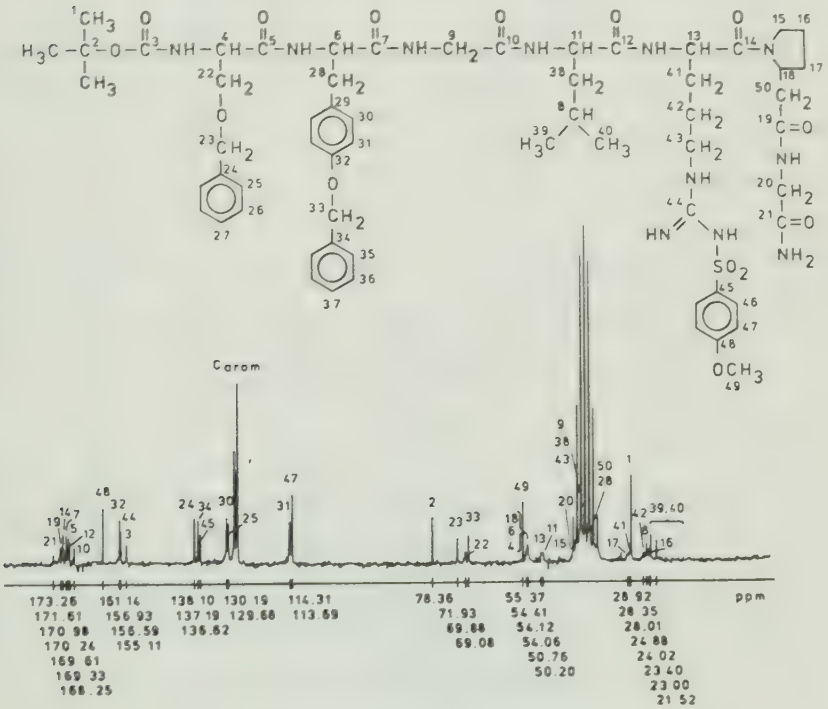


Abb. 32: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2, 250 mg, 20 900 Pulsinterf.

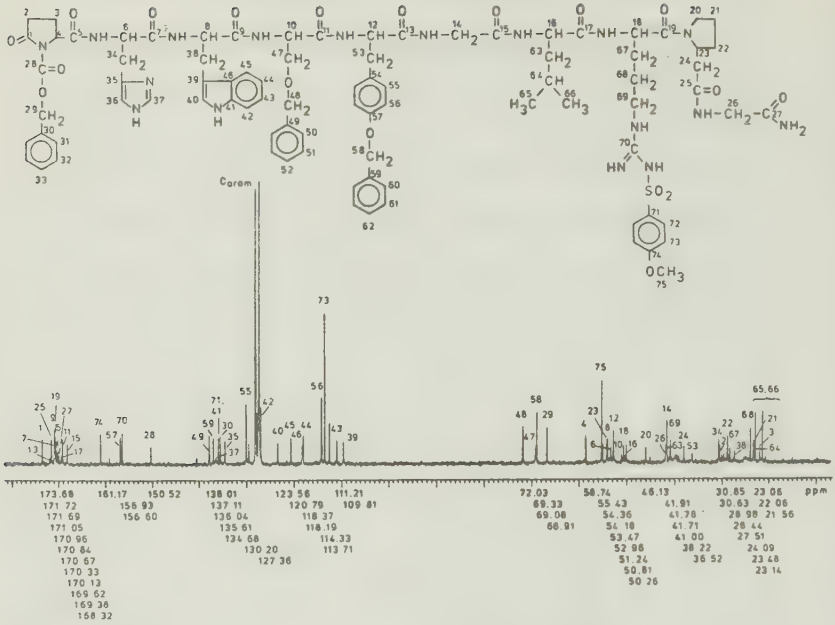
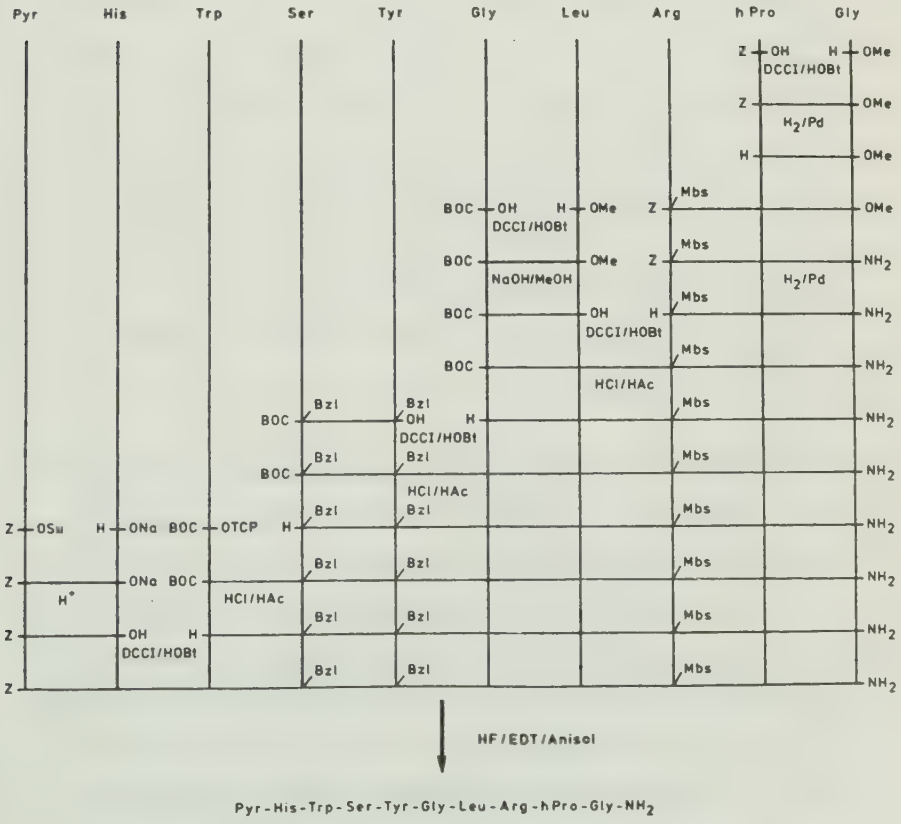


Abb. 33: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Pyr-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2, 200 mg in ^{12}C-DMSO-100 MHz, 53 000 Pulsinterferogramme

Bei der anschließenden Entfernung der BOC-Schutzgruppe mit Chlorwasserstoff/Essigsäure unter Stickstoffatmosphäre sowie Zusatz von Ethandithiol als Kationenfänger, konnten keine der von Wünsch beobachteten tertiär-Butylierungen des Indolsystems festgestellt werden. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung ergibt in drei Fließmittelsystemen homogenes Verhalten. Die Anfärbung

der Flecken erfolgt durch Reindel-Hoppe[129]- als auch Ehrlich's-Reagenz[130]. Die Kettenverlängerung zum Decapeptid wird mit dem Dipeptid Z-Pyr-His-OH, das durch Aktivesterkupplung von Z-Pyr-OSu mit Histidin-Natriumsalz gewonnen wird, vorgenommen. Die Abspaltungs- und Reinigungsbedingungen sind identisch mit denen der vorstehenden Synthesen.



Syntheseschema 6: Synthese des ($hPro^9$)-LH/FSH-"Releasing"-Hormons

5.7 Synthese des Decapeptidamids hPyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2

Verändert man den N-Terminus des LH/FSH-"Releasing"-Hormons durch Substitution der Pyroglutaminsäure gegen lineare Aminosäuren wie Leucin, Glutaminsäure, Glycin oder Sarcosin erhält man einen drastischen Abfall der biologischen Aktivität. Modifikation der Position 1 des Moleküls durch cyclische Aminosäuren wie Prolin[131], Hyroxyprolin[132], Cyclopentancarbonsäure[132], dem Sechsringanalogen der Pyroglutaminsäure[133] oder durch D-Pyroglutaminsäure[134] erbrachten weder die erhoffte Steigerung der biologischen Aktivität noch waren diese Analoga resistenter gegen Angriffe von Exopeptidasen. So zeigt z.B. das D-Pyr^1-Derivat nur 8 % Aktivität, das Cyclopentancarbonsäure-Derivat nur 1.4 %; dies zeigt, daß die Konformation der N-terminalen Aminosäure von essentieller Bedeutung ist.

Von einer Substitution der Pyroglutaminsäure gegen eine β-Aminosäure wurde nur einmal in der Literatur berichtet. Nicolics[132] verwendete die 2-Pyrrolidon-4-carbonsäure sowie das N-Methylanaloge dieser Verbindung. Alle diese Synthesen wurden nach der Merrifield-Methode durchgeführt; von einer klassischen Synthese mit verändertem N-Terminus in Form einer β-Aminosäure wurde bis jetzt nicht berichtet. Durch Einbau der β-Aminosäure Homopyroglutaminsäure wird in der folgenden Synthese der N-Terminus modifiziert.

Für die Synthese der Homopyroglutaminsäure bzw. 2-Oxo-5-pyrrolidinessigsäure stehen nur wenige Verfahren zur Verfügung. Während die Synthese nach Rudinger[135] ausgehend von N-Tosyl-glutaminsäure über N-Tosyl-pyroglutamylchlorid, Überführung deselben in das Diazoketon und Wolff-umlagerung mit Silberoxid das tosylgeschützte Produkt nur in geringer Menge ergibt, kann durch die verbesserte asymmetrische Synthese von Wakabayashi[136], die Homopyroglutaminsäure optisch rein und in guten Ausbeuten gewonnen werden.

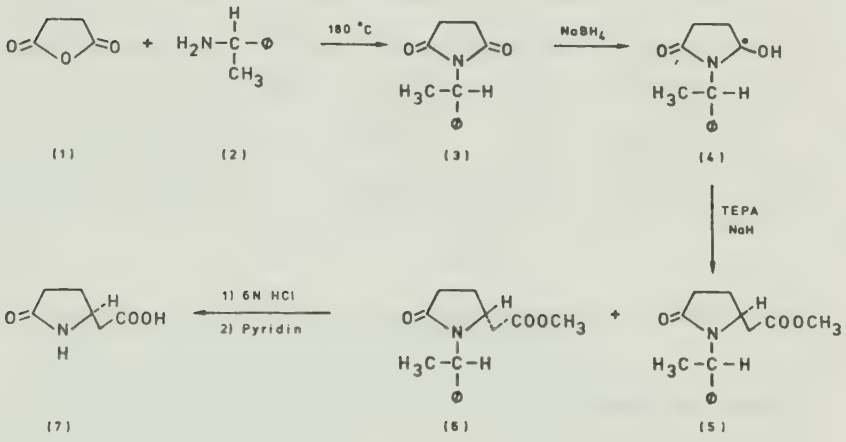
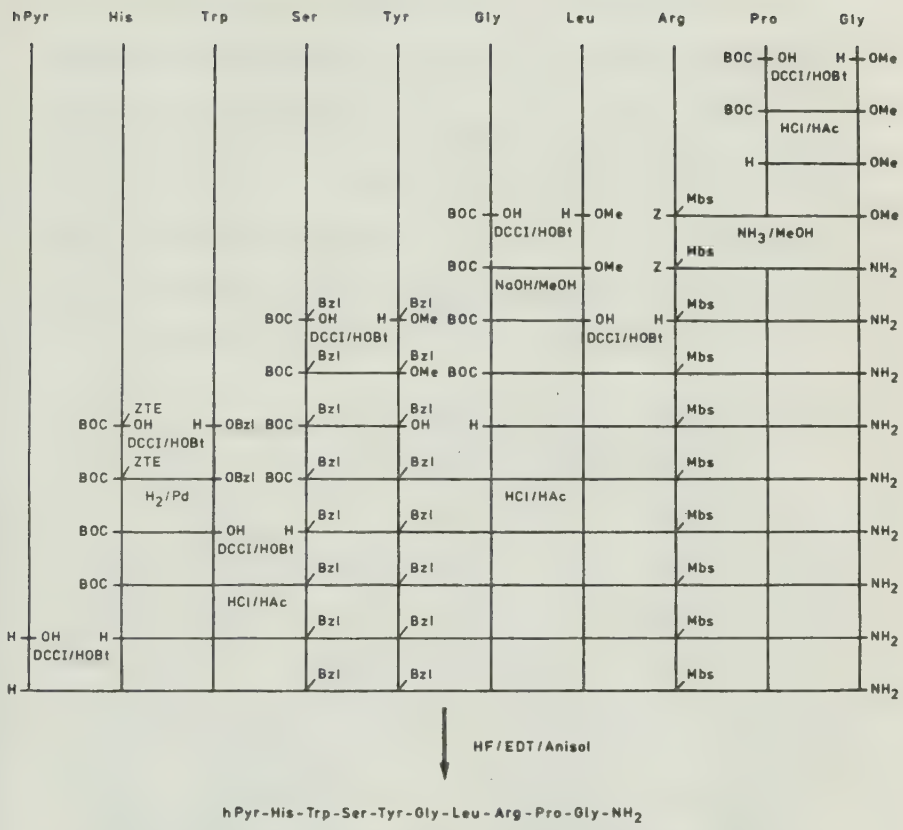


Abb. 34: Asymmetrische Synthese von Homo-pyroglutaminsäure.

Startmaterial dieser Synthese ist das Anhydrid der Bernsteinsäure (1), das mit S-(-)-α-Phenylethylamin (2) in das optisch aktive cyclische Imid (3) überführt wird. Mit Natriumborhydrid in Gegenwart von Chlorwasserstoff[137] kann eine der Carbonylfunktionen dieser Succinimidverbindung selektiv reduziert werden. Aus dem so erhaltenen Diastereomerengemisch der ω-Carbinollactame wird mit Diethylphosphonoessigsäuremethylester und Natriumhydrid in Dimethoxyethan als Lösungsmittel in einer Wittig-artigen Reaktion[138], die Ester (5 + 6), ebenfalls als Diastereomerengemisch erhalten. Nach Hydrolyse dieses Gemisches erhält man die Säuren, die durch einfache Umkristallisation, das optisch reine (S)-Isomere ergeben. Die asymmetrische Hilfsgruppe wird anschließend mit 6 N Salzsäure entfernt, dabei wird unter Ringöffnung die L-β-Aminoadipinsäure gebildet, die durch Pyridinbehandlung zur gewünschten Homopyroglutaminsäure (7) cyclisiert wird.

Der Aufbau des Decapeptidamids erfolgt wie aus dem Reaktionsschema zu ersehen ist, in ähnlicher Weise wie bei der Synthese des nativen Hormons. Zuerst wird der N-Terminus , durch Verwendung von BOC-Prolin und Glycinmethylester, synthetisiert. Als Kupplungsmethode findet hier die DCCI/HOBt-Variante Verwendung. Nach Entacylierung mit HCl/Essigsäure, Kupplung der so entstandenen Aminokomponente mit Z-Arg(Mbs)-OH und anschließende Überführung des Tripeptidesters mit Ammoniak in Methanol in das Amid, wird



Syntheseschema 7: Synthese des (hPyr[1])-LH/FSH-"Releasing"-Hormons

wie üblich durch Hyrogenolyse die Z-Schutzgruppe entfernt. Die Verlängerung zum Pentapeptidamid erfolgt mit BOC-Gly-Leu-OH, die Verlängerung zum Heptapeptidamid mit BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH und die Verlängerung zum Nonapeptidamid mit BOC-His-Trp-OH analog der ersten Synthese. Nach er-

folgter BOC-Abspaltung wird die Homopyroglutaminsäure, im Überschuß eingesetzt, mit einer DCCI/HOBt-Kupplung an das Nonapeptid gekuppelt. Die Abspaltung der beiden verbliebenen Benzylschutzgruppen sowie der Mbs-Gruppe, wird durch Behandlung des Peptids mit flüssigem Fluorwasserstoff in Gegenwart der Kationenfänger Ethandithiol und Anisol bei 0^{o} C vorgenommen. Nach Entfernen des Fluorwasserstoffs, wird der Rückstand in 0.1 N Essigsäure aufgenommen, mit

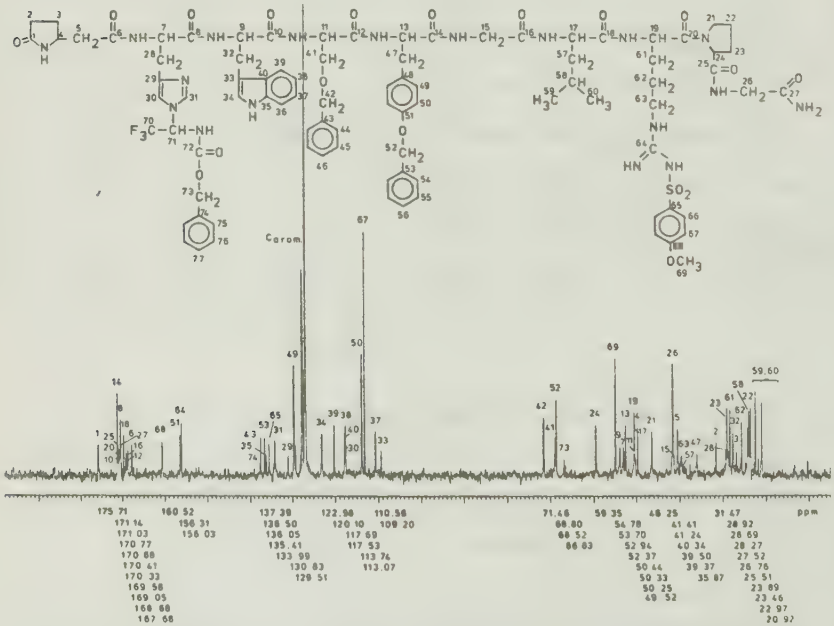


Abb. 35: ^{13}C-NMR-Spektrum von h-Pyr-His(ZTE)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2, 185 mg in 1.5 ml ^{12}C-DMSO-d_6, 15 600 Pulsinterf., 400 MHz

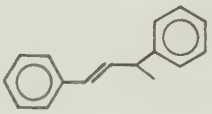
DOWEX-1X4-Anionenaustauscher (Acetatform) behandelt und lyophilisiert. Das Rohprodukt ist nach Reinigung per Verteilungschromatographie an Sephadex G 25 mit der Oberphase des Laufmittelsystems n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) und anschließender Ionenaustauschchromatographie mit einem Ammoniumacetatgradienten (0.01 - 0.3 M; pH 4.8 - 7.0), dünnschichtchromatographisch in den Fließmittelsystemen n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) sowie Benzol/Chloroform/Methanol/Wasser (40:40:40:5) einheitlich.

5.8 Synthese des Decapeptidamids Ecg-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2

Bei der zweiten Synthese dieser Arbeit, die eine Modifizierung des N-Terminus zum Inhalt hat, wird die Pyroglutaminsäure durch die Ecgoninsäure ersetzt. Die Ecgoninsäure wurde als Bestandteil des Alkaloids l-Cocain bei dessen oxidativen Abbau entdeckt[139,140]; es handelt sich um das N-Methylderivat der zuvor eingesetzten Pyrrolidonessigsäure.

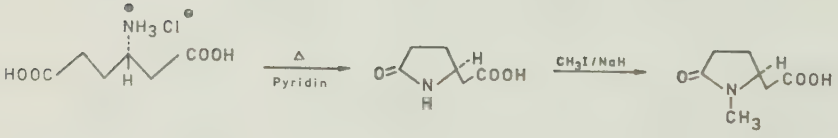
Der Aufbau dieser Verbindung erfolgt in Analogie zu der zuvor besprochenen Synthese von Homopyroglutaminsäure. Das durch Verlängerung des Carbinollactams (4) gewonnene Diastereomerengemisch der Ester (5) und (6) wird mit 6 N Salzsäure hydrolisiert. Man erhält so die β-Aminoadipinsäure; als Nebenprodukt wird das bicyclische System(8)

folgender Struktur gebildet:



(8)

Während der Synthese gebildetes Nebenprodukt (8).



(9) (7) (10)

Abbildung 36: Synthese von Ecgoninsäure aus β-Aminoadipinsäure

Die β-Aminoadipinsäure läßt sich nach Abtrennen dieses Olefins, durch Kochen in Pyridin zur Homopyroglutaminsäure cyclisieren, die durch Methyljodid in Gegenwart von Natriumhydrid in die Ecgoninsäure überführt wird.

Die Synthese des Decapeptidamids erfolgt anschließend in

analoger Weise wie zuvor für das h-Pyr-Decapeptidamid, wobei das Nonapeptid in diesem Falle mit Ecgoninsäure mit einer DCCI/HOBt-Kupplung zum Decapeptid verlängert wird.

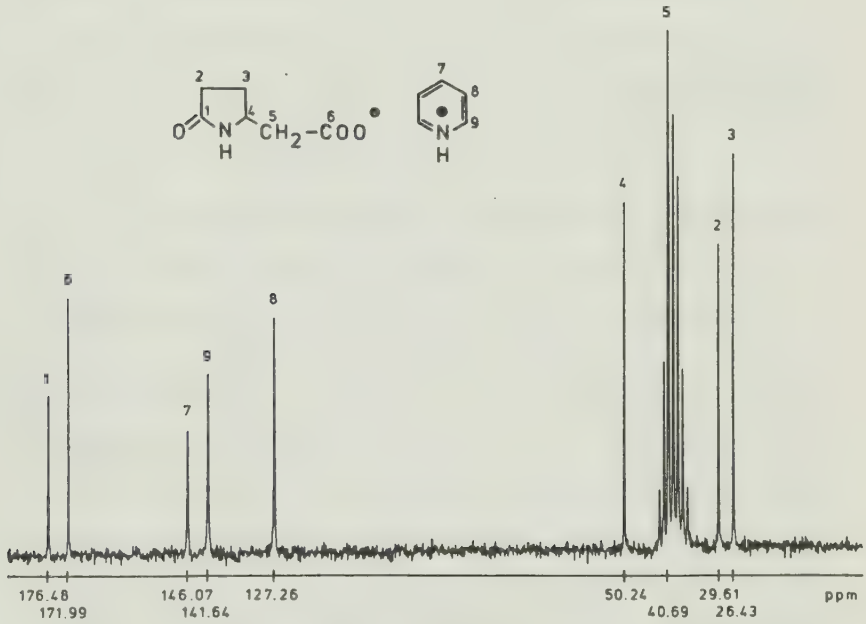


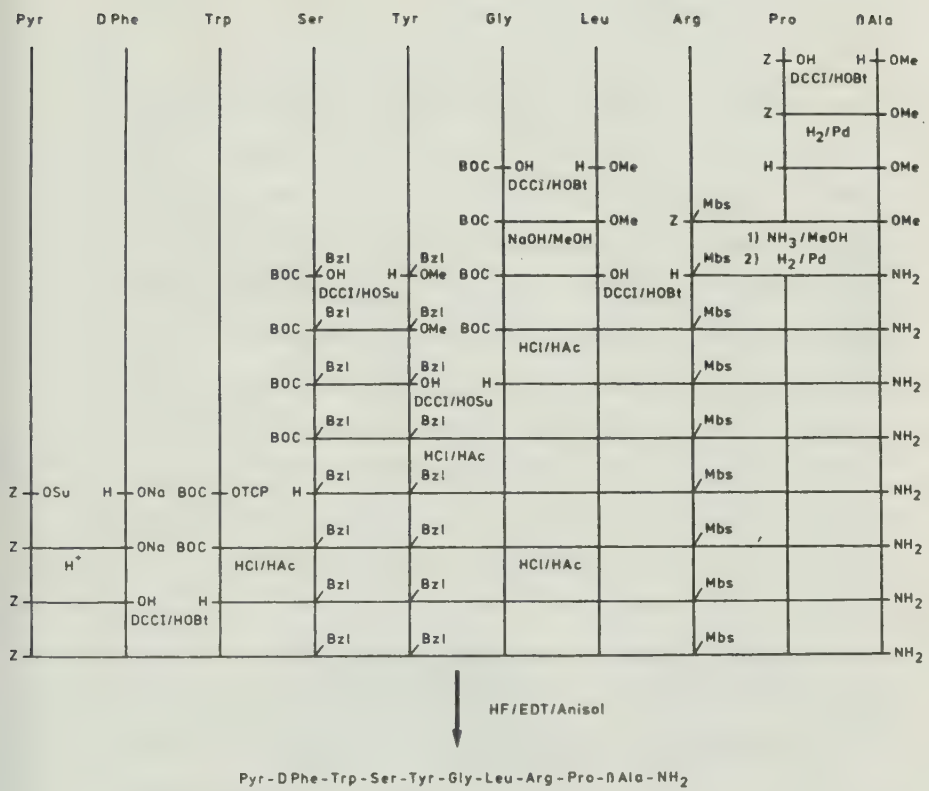
Abb. 37: ^{13}C-NMR-Spektrum von Homo-pyroglutaminsäure, 160 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 5200 Pulsinterf., 20.115 MHz

5.9 Synthese des Decapeptidamids Pyr-D-Phe-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-β-Ala-NH_2

Wie eingangs dieses Kapitels erwähnt, erhält man durch

Substitution des Histidins durch D-Phenylalanin[84,85,86], LH/FSH-Releasinghormonanaloge Verbindungen mit stark antagonistischen Eigenschaften. Durch zusätzlichen Einbau von β-Aminosäuren könnte diese Wirkung unter Umständen noch gesteigert und das Peptid gegen enzymatische Angriffe stabiler gemacht werden. Diese Intension führt zur ersten Synthese eines Antagonisten mit der Aminosäure β-Alanin als C-Terminus und D-Phenylalanin in Position 2.

Ausgangspunkt ist wiederum β-Alaninmethylester, der mit Z-Prolin gekuppelt zum Dipeptid Z-Pro-β-Ala-OMe führt. Die Z-Schutzgruppe wird durch Hydrierung mit Wasserstoff in Gegenwart von Palladium/Aktivkohle als Katalysator entfernt. Die Verlängerung zum Tripeptid wird mit Z-Arg(Mbs)-OH vorgenommen, das nach erfolgter Ammonolyse ebenfalls hydriert wird. Durch Kupplung mit BOC-Gly-Leu-OH erhält man das Pentapeptidamid. Nach Entfernen der BOC-Schutzgruppe mit Chlorwasserstoff/Essigsäure wird mit dem Dipeptid BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH mit Hilfe der DCCI/HOSu-Methode zum geschützten Heptapeptidamid verlängert. Das Octapeptid BOC-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2 wird durch Aktivesterkupplung von BOC-Tryptophan-2,4,5-trichlorphenylester mit dem von der BOC-Gruppe befreiten Heptapeptidamid erhalten. Aktivesterkupplung zwischen Z-Pyroglutaminsäure-N-Hydroxysuccinimidester und dem Natriumsalz von D-Phenylalanin ergibt das N-terminale Dipeptidfragment, das schließlich in einer DCCI/HOBt-Kupplung mit



Syntheseschema 8: Synthese des (D-Phe^2, ß-Ala-NH$_2$^{10})-LH/FSH-"Releasing"-Hormons

dem von der BOC-Gruppe befreiten Octapeptidamid das geschützte Hormonanaloge ergibt. Die Aufarbeitung und Reinigung erfolgt wie oben beschrieben.

6. Synthese des Decapeptidamids Pyr-D-Phe-Trp-Ser-Tyr-β-Ala-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2

Ein weiteres Analoges des LH/FSH-"Releasing"-Hormons mit antagonistischen Eigenschaften sollte sich ergeben, wenn man neben dem Histidin, das wiederum durch D-Phenylalanin ersetzt werden soll, eine β-Aminosäure in die für die biologische Aktivität wichtige Position 6 des Moleküls einbaut. Diese Überlegung führt zur Synthese des Decapeptidamid Pyr-D-Phe-Trp-Ser-Tyr-β-Ala-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2. Auch hier wird die in den vorhergegangenen Synthesen bewährte Fragmentkupplungstechnik verwendet, die möglichst wenige Verseifungsschritte sowie die nur einmalige acidolytische Behandlung des labilen Tryptophans beinhaltet.

Die Synthese dieses Hormonanalogen wird bis zum Heptapeptid analog Synthese 3 durchgeführt. Nach Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit Chlorwasserstoff/Essigsäure erhält man das deblockierte Heptapeptidamid H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2, das in einer Aktivesterkupplung mit BOC-Tryptophan-2,4,5-trichlorphenylester verlängert und anschließend mit Chlorwasserstoff/Essigsäure unter Stickstoffatmosphäre in Gegenwart von Ethandithiol von der BOC-Gruppe befreit wird. Das Decapeptidamid wird durch Kupplung der Fragmente Z-Pyr-D-Phe-OH und H-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2 erhalten. Die Abspaltung der verbliebenen Schutzgruppen wird nach

Sakagibara mit Fluorwasserstoff vorgenommen. Die Reinigung des so erhaltenen Rohpeptids erfolgt in gleicher Weise wie bei den anderen weiter oben beschriebenen Synthesen.

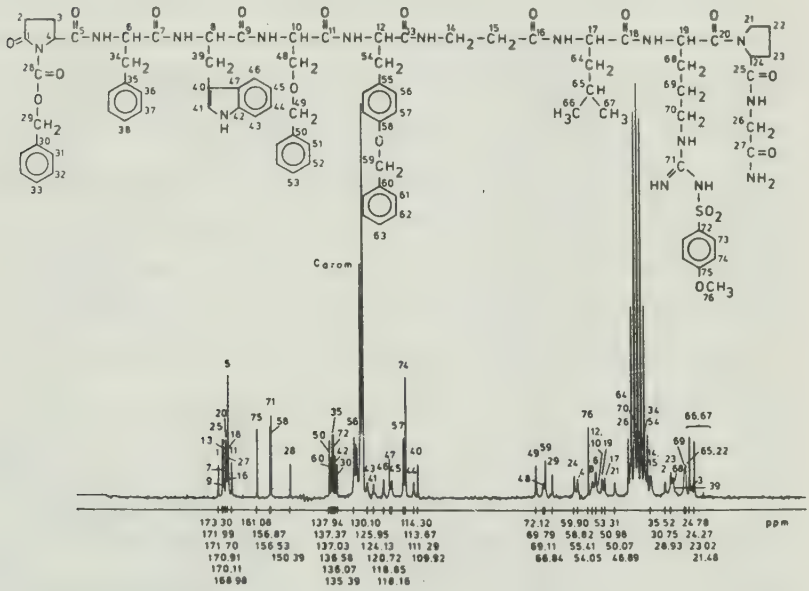


Abb. 38: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Pyr-D-Phe-Trp-Ser(Bzl)-Tyr (Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2, 220 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 66 000 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

6.1 Synthese des Decapeptidamids Pyr-D-Phe-Trp-Ser-Tyr-β-Ala-Leu-Arg-Pro-β-Ala-NH_2

Unter Berücksichtigung der bei den vorhergegangenen Synthesen gewonnenen Erkenntnisse, wird ein weiteres antagonistisch wirkendes Decapeptidanalogon des LH/FSH-"Releasing"-Hormons synthetisiert, bei dem die Position 2 durch D-Phenylalanin, die Positionen 6 und 10 jeweils mit β-Alanin besetzt werden. Der Aufbau erfolgt analog wie in Synthese 4 für Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-β-Ala-Leu-Arg-Pro-β-Ala-NH_2 vom C-terminalen Ende her mit der Kupplung Z-Pro-OH mit β-Alaninmethylester. Verwendung als Kupplungsreagenz findet DCCI/HOBt. Nach Abspaltung der Z-Schutzgruppe kann mit Z-Arg(Mbs)-OH als Carboxylkomponente zum Tripeptid Z-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-OMe verlängert werden. Die übliche Behandlung mit Ammoniak in Methanol erbringt das gewünschte Amid. Die Abhydrierung der Z-Schutzgruppe wird mit Palladium/Aktivkohle als Katalysator im Durchflußverfahren durchgeführt. Das Pentapeptid BOC-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2 wird durch Kupplung von BOC-β-Ala-Leu-OH mit dem zuvor synthetisierten Tripeptid mit DCCI/HOBt erhalten. Die Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit Chlorwasserstoff/Essigsäure und Kupplung mit dem Fragment BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH ergibt das geschützte Heptapeptidamid BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2, das nach Entacylierung mit dem Aktivester BOC-Tryptophan-2.4.5-trichlorphenylester zum Octapeptid verlängert wird. Die Entfernung der BOC-Schutz-

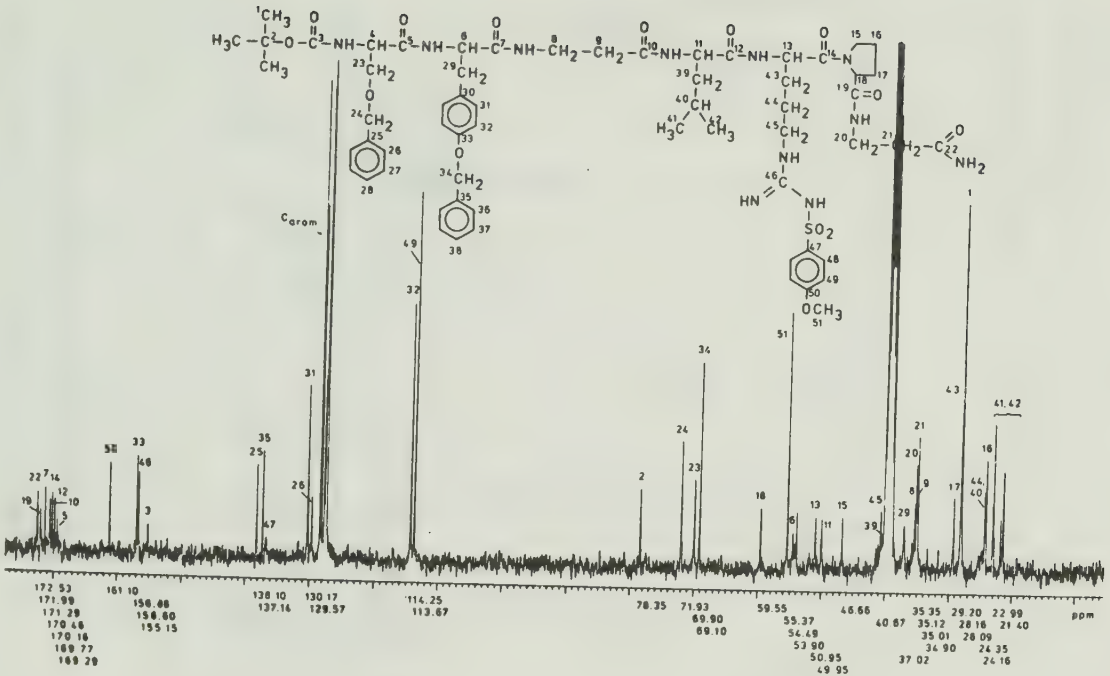


Abb. 39: ^{13}NMR-Spektrum von BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2, 225 mg in DMSO-d_6, 53 000 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

gruppe am Tryptophanrest wird unter Stickstoff und Zugabe von Kationenfänger (Ethandithiol) vorgenommen. Fragmentkupplung zwischen dem Dipeptid Z-Pyr-D-Phe-OH und dem Octapeptidamid als Aminokomponente ergibt das geschützte Decapeptid, das wie üblich von den verbliebenen Schutzgruppen befreit und gereinigt wird.

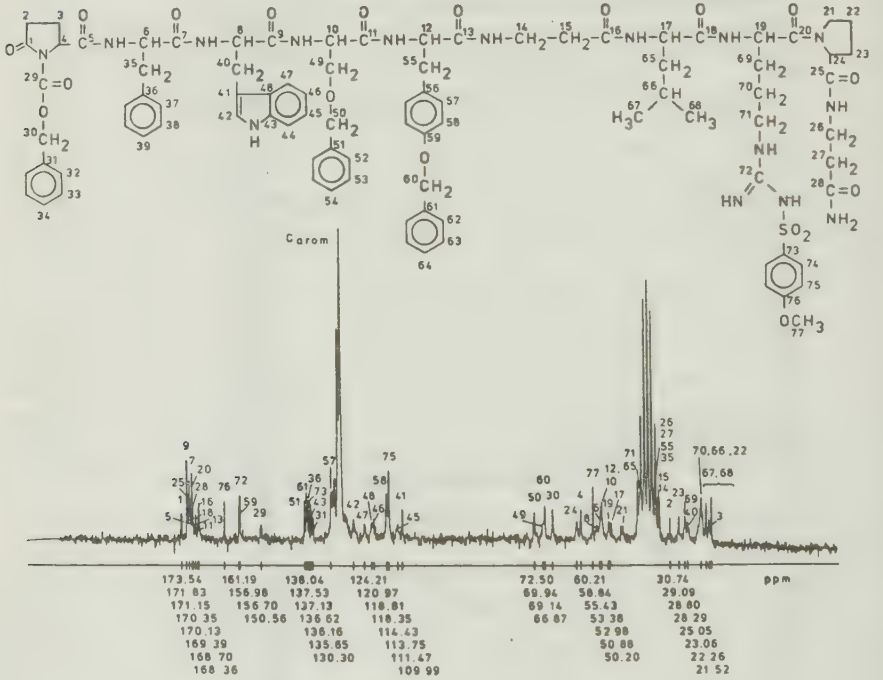
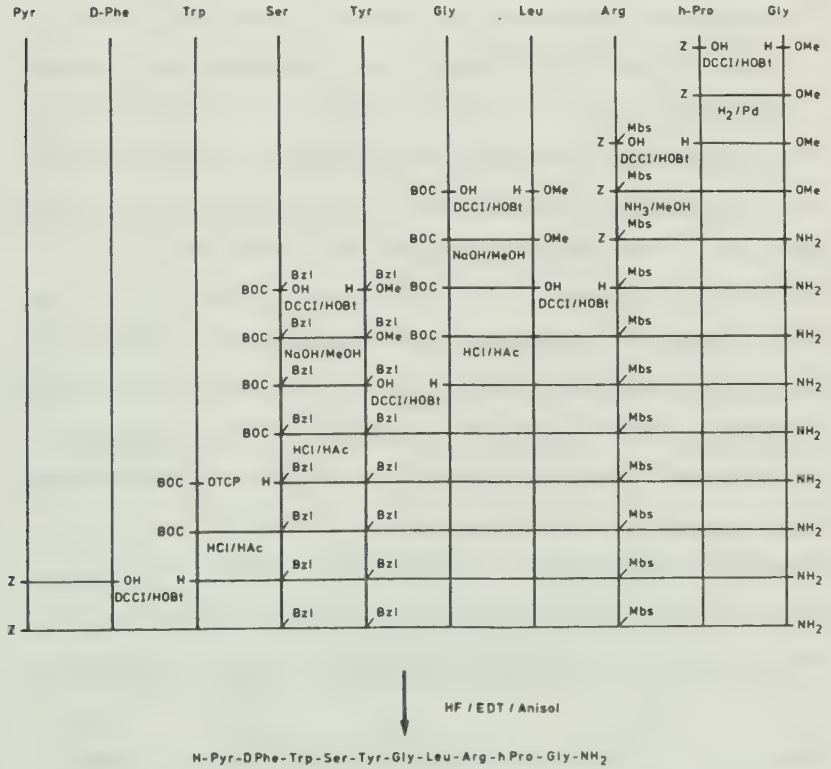


Abb. 40: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Pyr-D-Phe-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2, 300 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 14 800 Pulsinterferogr. , 20.115 MHz,

6.2 Synthese des Decapeptidamids Pyr-D-Phe-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-hPro-Gly-NH_2

Durch Austausch des Histidins durch D-Phenylalanin sowie Prolin durch Homoprolin wird ein Decapeptidamid des LH/FSH-Releasinghormons zugänglich, das antagonistische Eigenschaften zeigen sollte. Dabei wurde die Fragmentkondensationsmethode beibehalten. Die Kupplungen werden bis zum Hepta-



Syntheseschema 11: Synthese des (D-Phe^2, hPro^9)-LH/FSH-"Releasing"-Hormons

peptid mit der DCCI/HOBt-Methode durchgeführt. Der Aufbau erfolgt wie bei dem Histidinanalogen vom C-terminalen Ende her. Durch Kupplung von Z-h-Pro-OH mit Glycinmethylester erhält man das geschützte Dipeptid, das nach Entacylierung mit Wasserstoff und Palladium/Aktivkohle als Katalysator mit Z-Arg(Mbs)-OH als Carboxylkomponente zum Tripeptid Z-Arg(Mbs)-hPro-Gly-OMe verlängert und dann mit Ammoniak in Methanol zum Amid umgesetzt wird. Die Kupplung zum Pentapeptidamid erfolgt nach wiederholter Hydrierung mit BOC-Gly-Leu-OH; die Abspaltung der BOC-Gruppe erfolgt mit 1.2 N HCl in Essigsäure. Die Kupplung zum geschützten Heptapeptidamid wird mit BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH vorgenommen. Nach Entacylierung wird mit BOC-Tryptophan-2,4,5-trichlorphenylester zum Octapeptid umgesetzt, das wiederum mit HCl/Essigsäure unter Stickstoffatmosphäre unter Zusatz von Ethandithiol deblockiert wird. Durch Kupplung mit Z-Pyr-D-Phe-OH läßt sich das geschützte Decapeptidamid gewinnen, das analog den vorhergegangenen Peptiden durch Behandlung mit Fluorwasserstoff von den Schutzgruppen befreit wird. Das so erhaltene Rohpeptid wird wie zuvor durch Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose gereinigt und gefriergetrocknet.

7. Entwicklung neuerer Schutzgruppen vom Sulfonamidtyp

Obwohl die p-Toluolsulfonylschutzgruppe[141] als N^{ω}-Guanidinoschutz in Form eines Sulfonamids in der Peptidchemie

wegen der billigen Ausgangsmaterialien und der Stabilität der Schutzgruppe unter den üblichen Kupplungs- und Abspaltungsbedingungen eine breite Anwendung gefunden hat, ist, wegen der drastischen Abspaltungsbedingungen, die sehr oft zu Nebenreaktionen führen[142-146], ihre Bedeutung mit der Entwicklung neuer Blockierungsmethoden immer weiter zurückgegangen.

Ein wesentlicher Fortschritt in dieser Richtung war die Einführung der bei den vorhergegangenen Synthesen verwendeten p-Methoxybenzolsulfonyl (Mbs)-Gruppe[115], die wie die Tosyl-Schutzgruppe in einfacher Weise unter Schotten-Baumann-Bedingungen in das Molekül eingeführt werden kann. Der Mbs-Rest verhält sich unter den üblicherweise acidolytisch, mit HBr/Essigsäure bzw. Trifluoressigsäure vorgenommenen Abspaltung der intermediären Z- bzw. BOC-Schutzgruppen, innert. Die Deblockierung kann durch Methansulfonsäure, Trifluormethansulfonsäure oder durch Behandlung mit flüssigem Fluorwasserstoff ohne Nebenreaktionen vorgenommen werden.

Diese Eigenschaften waren Anlaß, zu überprüfen, ob die Mbs-Schutzgruppe auch für andere basische Seitenkettenfunktionen von Aminosäuren oder auch als α-Aminoschutzgruppe Verwendung finden kann.

7.1 p-Methoxybenzolsulfonyl- als Schutzgruppe für Lysin und Ornithin

Die selektive Einführung des Mbs-Restes in die ε- bzw. δ-Aminogruppe des Lysins bzw. Ornithins gelingt über die von Kurtz[147] entwickelte Methode der jeweiligen Kupferkomplexe dieser basischen Diaminocarbonsäuren. Die in basischem Medium löslichen Kupferkomplexe lassen sich nach Umsetzung mit p-Methoxybenzolsulfonylchlorid zum N^{ε}- bzw. N^{δ}-Mbs-Kupferkomplex mit Schwefelwasserstoff zum freien N^{ε}- bzw. N^{δ}-pMethoxybenzolsulfonyl-derivat zerlegen. Die anschließende Acylierung mit BOC-Azid bzw. Carbobenzoxychlorid führt zum entsprechenden N^{α}-BOC-N^{ε}-, N^{α}-Z-N^{ε}- bzw. N^{α}-BOC-N^{δ}-,N^{α}-Z-N^{δ}-Mbs-geschützten Derivat. In der folgenden Tabelle sind diese Derivate im einzelnen aufgeführt:

Derivat	F_p	α_D^{20}	R_f-Wert
N^{ε}-Mbs-Lysin	>200°C	+17.2(c=1, MeOH)	R_{fA}: 0.42
N^{δ}-Mbs-Ornithin	>200°C		R_{fA}: 0.39
Z-N^{ε}-Mbs-Lysin. DCHA	140°C		R_{fA}: 0.78
BOC-N^{ε}-Mbs-Lysin. DCHA	129°C	-2.9(c=2,DMF)	R_{fA}: 0.83
BOC-N^{δ}-Mbs-Ornithin	151°C		R_{fD}: 0.41
Z-N^{δ}-Mbs-Ornithin	105°C	+2.0(c=1, MeOH)	R_{fA}: 0.78

Tabelle 2: Physikalisch-chemische Daten der N^{ε}- bzw. N^{δ}-Mbs-geschützten Derivate des Lysins und Ornithins

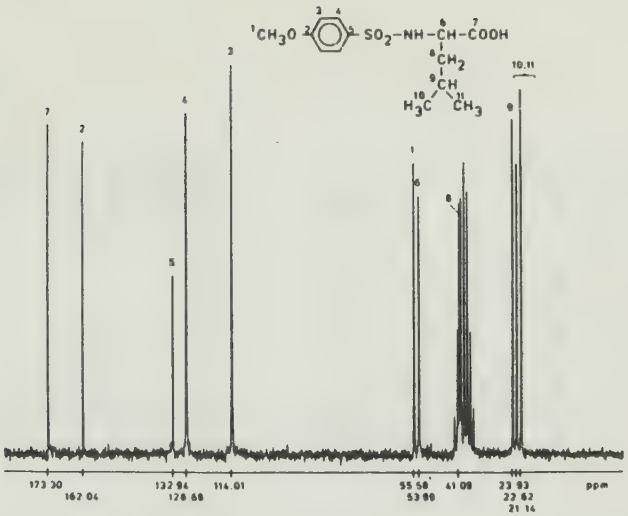


Abbildung 41: ^{13}C-NMR-Spektrum von Mbs-Leucin, 310 mg in 1 ml DMSO-d_6, 43 000 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

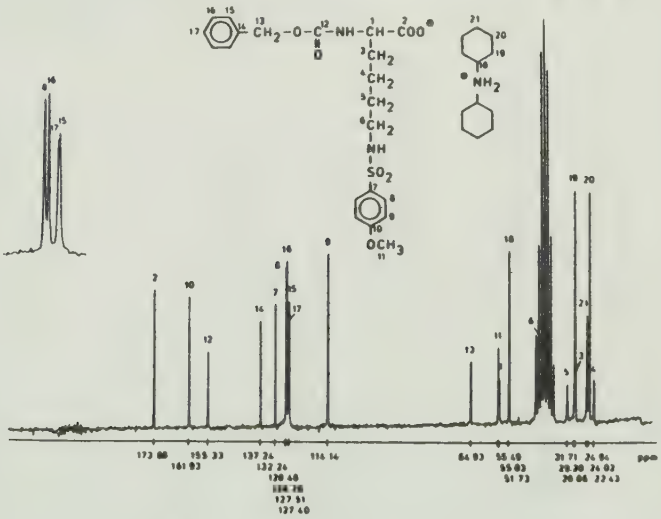


Abbildung 42: ^{13}C-NMR-Spektrum von N^{α}-Z-N^{ε}-Mbs-Lysin-Dicyclohexylammoniumsalz, 300 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 48 300 Pulsinterferogr., 20.115 MHz, prot.brt.-ent

Tabelle 3:

^{13}C-Chemische Verschiebungen der N^{ε}- bzw. N^{δ}-Mbs-Derivate des Lysins bzw. Ornithins gemessen in DMSO-d_6

	Aminosäureteil	COOH	C_α	C_β	C_γ	C_δ	C_ε
H-Lys(Mbs)-OH		170.40	53.93	28.65	22.34	30.66	-
	Schutzgr.-teil	BOC/Z		Mbs		DCHA	
		-		55.55(OCH_3)		-	
				161.95			
				132.18			
				128.61			
				114.24			
	Aminosäureteil	COOH	C_α	C_β	C_γ	C_δ	C_ε
Z-Lys(Mbs)-OH. DCHA		173.88	55.03	28.86	22.43	31.71	-
	Schutzgr.-teil	BOC/Z		Mbs		DCHA	
		155.33(CO)		55.49(OCH_3)		51.73	
		137.24		161.93		29.20	
		128.20		132.24		24.94	
		127.51		128.48		24.02	
		127.40		114.14			
		64.93(CH_2)					

BOC-Lys(Mbs)-OH. DCHA	Aminosäureteil	COOH	C_α	C_β	C_γ	C_δ	C_ε
		174.II	54.58	28.92	22.32	31.93	-
	Schutzgr.-teil	BOC/Z		Mbs		DCHA	
		154.77(CO)		55.43(OCH_3)			
		77.28		161.93		51.73	
		28.06		132.24		29.54	
				128.48		24.99	
				114.14		24.08	
W-Orn(Mbs)-OH	Aminosäureteil	COOH	C_α	C_β	C_γ	C_δ	
		17o.91	52.12	27.73	25.18	42.34	
	Schutzgr.-teil			Mbs			
				56.10(OCH_3)			
				162.44			
				132.26			
				129.02			
				114.70			
Z-Orn(Mbs)-OH	Aminosäureteil	COOH	C_α	C_β	C_γ	C_δ	
		173.81	53.71	28.30	25.92	42.23	
	Schutzgr.-teil	BOC/Z		Mbs		DCHA	
		156.19(CO)		55.64(OCH_3)		-	
		137.03		162.10			

Z-Orn(Mbs)-OH Forts.	Schutzgr.-teil	BOC/Z		Mbs		
		128.34		132.26		
		127.71		128.68		
		65.59(CH_2)		114.30		
	Aminosäureteil	COOH	C_α	C_β	C_γ	C_δ
BOC-Orn(Mbs)-OH		173.94	53.10	28.12	25.73	42.06
	Schutzgr.-teil	BOC/Z		Mbs		DCHA
		155.45(CO)		55.54		-
		77.96		162.05		
		28.12		132.18		
				128.54		
				114.26		

Wie sich bei der anschließenden Überprüfung der Stabilität dieser geschützten Aminosäurederivate herausstellte, ist eine selektive Entfernung der BOC- bzw. Z-Schutzgruppe mit den üblichen acidolytischen Agentien wie Chlorwasserstoff/Essigsäure, Bromwasserstoff/Essigsäure oder Trifluoressigsäure in Methylenchlorid ohne Beeinflussung des Mbs-Schutzes möglich. Was die Abspaltungsbedingungen für die sulfonamidartig gebundene Mbs-Gruppe betrifft, so ist eine Abspaltung nur mit Natrium in flüssigem Ammoniak[148] oder durch Phosphoniumjodid[149] möglich, wohingegen die Abspaltung mit den üblichen acidolytischen Medien wie Trifluoressigsäure, Methansulfonsäure, Bortristrifluoracetat, Bromwasserstoff sowie in flüssigem Fluorwasserstoff nicht gelingt. Diese Stabilität der Mbs-Gruppe an der N^{ε}- bzw. N^{δ}-Aminogruppe des Lysins bzw. Ornithins könnte diese Verbindungen für die Festphasensynthese interessant machen.

7.2 p-Methoxybenzolsulfonyl- als Imidazol-Schutzgruppe

Der Einsatz von ausschließlich N^{α}-geschützten Histidinderivaten stellt den Peptidchemiker immer wieder vor große Probleme. So ist z.B. die Verbindung N^{α}-Z-His-OH aufgrund ihres dipolaren Charakters in den für die Peptidsynthese verwendeten Lösungsmitteln praktisch unlöslich und entzieht sich damit jedweder Carboxy-Aktivierung. Dieser Mißstand, bedingt durch die Basizität des Imidazolrings, der jederzeit an der Kupplung teilnehmen kann, führte in der Folge zu einer Viel-

zahl von Imidazolschutzgruppen, die aber allè nicht in der Lage sind, diese Basizität des Heterocyclus zurückzudrängen. Dies veranlaßte Fujii[148], die bekannt gute Stabilität der Tosylamin-Gruppierung auszunutzen und die Imidazolfunktion durch Tosylierung zu schützen.

Durch Einführung des Tosyl-restes unter den üblichen Schotten-Baumann-Bedingungen lassen sich so, gutlösliche, für die Peptidsynthese verwendtbare Derivate wie BOC-His(Tos)-OH, Z-His(Tos)-OH, AOC-His(Tos)-OH sowie NPS-His(Tos)-OH gewinnen. Die Tosylgruppe hat aber leider den Nachteil der Instabilität gegen Alkalien, ja selbst gegen das bei DCCI-Kupplungen oft verwendete Hilfsreagenz 1-Hydroxybenzotriazol[149,150].

Um diese Instabilität eventuell zu umgehen, wird versucht, die Mbs-Gruppe in das Histidinderivat Z-His-OH einzuführen, was auch dann unter Erhalt der optischen Aktivität gelang. Das so entstandene Z-His(Mbs)-OH kann als DCHA-Salz isoliert und charakterisiert werden. Die Verbindung zeichnet sich durch gute Löslichkeit und gute Extrahierbarkeit in organischen Solventien aus. Die Erfahrungen wurden unterdessen von einer japanischen Arbeitsgruppe[151] bestätigt, die die Mbs-Gruppe in BOC-Histidin eingeführt haben. Die Mbs-Gruppe läßt sich im Gegensatz zur N^{im}-Tosyl-Gruppe nicht unter den für die BOC-Abspaltung verwendeten Agentien wie Trifluoressigsäure/Anisol abspalten. Als Abspaltungsreagenzien kom-

men neben der HF-Methode sowie der Abspaltung mit Methan- bzw. Trifluormethansulfonsäure, die Abspaltung mit absoluter Trifluoressigsäure in Gegenwart von fünf Äquivalenten Dimethylsulfid[151] in Betracht. Die Einwirkungszeit dieses Mediums beträgt etwa 40 min.

7.3 p-Methoxybenzolsulfonyl- als N^{α}-Aminoschutz

Ermutigt durch die zuvor genannten Ergebnisse, wird im Verlauf der Arbeit versucht, die Mbs-Gruppe auch als N^{α}-Schutzgruppe nutzbar zu machen. Die Einführung der Schutzgruppe in die gängigen Aminosäuren gelingt in den meisten Fällen gut bis sehr gut. Die dargestellten Derivate und deren physikalischen Daten sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Mbs-Aminosäure	Fp	$(\alpha)_D$	R_f	Ausb.%
Mbs-Glycin	124-125	-	D 0.60	70
Mbs-β-Alanin	123	-	D 0.24	77
Mbs-Alanin	99-100	-40.5(c= 2,DMF)	D 0.54	72
Mbs-Prolin	107	-111.6(c= 1, MeOH)	D 0.28	88
Mbs-Phenylalanin	136-137	-12.7(c= 2, DMF)	D 0.45	75
Mbs-γ-Aminobutters.	108	-	D 0.44	65
Mbs-Tryptophan*	196-197	-12.9(c= 1, MeOH)	D 0.39	87

Mbs-Leucin*	204	+32.5(C= 2,DMF)	D 0.46	80
Mbs-Methionin	115-117	-9.1(c=1, DMF)	D 0.36	78
Mbs-Glutamins.	113	+11.6(c= 1, MeOH)	A 0.65	32
Mbs-Pyroglutamins.*	206-208	-6.8(c= 1, DMF)	D 0.45	77
Mbs-Valin	102-105	-17.7(c= 1, MeOH)	D 0.37	71
Mbs-Isoleucin	91	-1.9(c=1, DMF)	A 0.79	32

*= DCHA-Salz

Tabelle 4: Physikalisch-chemische Daten von N^{α}-Mbs-geschützten Aminosäuren

Stellvertretend für die ^{13}C-NMR-Spektren der N^{α}-Mbs-Aminosäurederivate soll hier das Mbs-Leucin abgebildet werden. Die ^{13}C-chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Die Abspaltung der Mbs-Gruppe dieser N^{α}-geschützter Derivate läßt sich analog der von du Vigneaud[152] gefundenen Abspaltung des Tosylrestes reduktiv mit Natrium in flüssigem Ammoniak sowie mit der von E. Fischer[153] gefundenen Reduktionsmethode mit Phosphoniumjodid entfernen. Diese harten Abspaltungsbedingungen schränken die Verwendung dieser Deri-

Name	Aminosäureteil					Schutzgruppe
	COOH	C_α	C_β	C_γ	$C_{\delta/S}$	$OCH_3/C_{arom.}$
Mbs-Glycin	170.33	43.84				55.62 162.24 132.40 128.77 114.27
Mbs-γ-Amino-buttersäure	173.81	41.83	24.49	30.63		55.53 161.99 132.15 128.51 114.18
Mbs-Alanin	173.54	51.33			18.68	55.82 162.33 133.26 128.87 114.43
Mbs-Valin	172.52	61.35	30.57		19.19 18.05	55.77 162.22 133.15 128.94 114.14
Mbs-Leucin	173.30	53.99	41.09	23.93	22.62 21.14	55.58 162.04 132.94 128.68 114.01
Mbs-Methionin	172.63	54.29	31.59	29.26	14.30	55.60 162.10 132.92 128.65 114.09
Mbs-Phenylalanin	172.42	57.44	37.94		136.80 129.26 128.22 126.59	55.62 161.95 132.70 128.54 114.00
Mbs-Prolin	173.20	60.44	30.40	24.25	48.38	55.66 162.73 130.07 129.39 114.49

Mbs-β-Alanin	172.22	38.59	34.16			55.58 162.10 131.80 128.62 114.30
Mbs-Glutaminsäure	173.52 (α) 172.61 (γ)	54.85	27.51	29.67		55.70 162.16 132.88 128.68 114.18
Mbs-Pyroglutaminsäure.DCHA	173.47 (CO) 172.56 (COOH)	62.46	30.92	39.73	51.72 28.87 24.84 24.04 (DCHA)	55.58 162.89 131.07 113.33
Mbs-Isoleucin	172.16	59.96	36.94	24.44	10.85 15.34	55.53 161.99 132.83 128.68 113.90
Mbs-Tryptophan DCHA	172.33	57.74	28.76 51.66 28.76 24.84 23.98 (DCHA)		135.73 127.94 123.45 120.15 118.62 117.65 110.83 110.43	55.36 161.70 132.03 128.51 113.73
Mbs-Glycyl-glycin	170.92 (COOH) 168.14 (CO)	45.19 (Gly 1) 40.69 (Gly 2)				55.60 162.33 131.83 128.88 114.31

Tabelle 5: ^{13}C-chemische Verschiebungen von N^{α}-Mbs-geschützten Aminosäuren gemessen in DMSO-d_6

vate für die Peptidsynthese etwas ein, sind aber zur Darstellung stabiler N^{α}-geschützter Aminosäurechloride, zur Darstellung von N-Methylaminosäuren sowie zur Darstellung N-terminal permanent geschützter Peptide durchaus von Bedeutung.

7.4 Die 2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-Schutzgruppe

Das Bestreben, neue N^{ω}-Guanidinoschutzgruppen vom Sulfonamidtyp zu finden, die acidolytisch abspaltbar sind, wird in neuerer Zeit besonders von japanischen Arbeitsgruppen verfolgt. So wurden von Yajima[154,155] die Mesitylsulfonyl (Mts)- und von Fujino[156] die 4-Methoxy-2.6-dimethylbenzolsulfonyl (Mds)-Gruppe als Guanidinoschutz sowie von Fukuda[157] die Toluolmethylsulfonyl (Pms)-Gruppe als N^{ε}- Aminoschutz des Lysins entwickelt.

Die Mds-Gruppe, die als Derivat der oben verwendeten Mbs-Gruppe angesehen werden kann, zeichnet sich dadurch aus, daß sie durch Trifluoressigsäure/Thioanisol entfernt werden kann, aber sich resistent gegen Chlorwasserstoffbehandlung als auch gegen Hydrogenolyse erweist. Die Mts-Gruppe ist ebenfalls stabil gegen Trifluoressigsäure, Hydrogenolyse sowie gegen Hydrazinhydrat und 1 M Natriumhydroxid. Die Deblockierung kann entweder durch Methansulfonsäure, Trifluormethansulfonsäure oder durch flüssigen Fluorwasserstoff vorgenommen werden.

Betrachtet man diese Schutzgruppen etwas näher, so ist festzustellen, daß eine Anhäufung von Substituenten mit +I-Effekt am Benzolkern offensichtlich die Abspaltung erleichtert. Dieser Effekt sollte sich verstärken, wenn man statt den drei Methylgruppen in der Mts-Schutzgruppe, das

2.4.6-Triisopropylderivat verwendet. Diese Verbindung hätte auf Grund ihrer Lipophilie insbesondere bei größeren Peptiden starke lösungsvermittelnde Eigenschaften, außerdem ist durch die raumerfüllenden Isopropylgruppen die Tendenz zu Nebenreaktionen wie z.B. Lactambildung während der Kupplung aus sterischen Gründen weitgehend eingeschränkt.

7.4.1 Darstellung von 2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl (TIP)-verbindungen des Arginins und Histidins

Das zur Darstellung dieser Sulfonamidmaskierung benötigte 2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid, läßt sich nach der Methode von Khorana[158] aus Triisopropylbenzol und Chlorsulfonsäure in 85 % Ausbeute als farblose Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 97° C gewinnen. Die Einführung in N^{α}-Z-Arginin gelingt unter den üblichen alkalischen Schotten-Baumann-Bedingungen mit Aceton als Lösungsvermittler problemlos und racemisierungsfrei in guten Ausbeuten. Die so erhaltene Verbindung wird wegen ihrer schlechten Kristallisierbarkeit mit Dicycloheylamin in das DCHA-Salz überführt. Die Aufhebung der N^{α}-Z-Gruppierung durch 20 % Bromwasserstoff in Essigsäure unter Erhalt der N^{ω}-Schutzgruppe macht die Verbindung H-Arg(TIP)-OH zugänglich, die mit BOC-Azid in das N^{α}-BOC-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-Arginin überführt werden kann. Der N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-argininmethylester wird aus Z-Arg (TIP)-OH, Methanol und DCCI nach der von Weber[159] gefun-

denen Kupplungsmethode,unter Zuhilfenahme katalytischer Mengen HOBt und Pyridin, dargestellt. Nach Abspaltung der Z-Schutzgruppe, steht der N^{ω}-geschützte Ester als Aminokomponente zur Verfügung.

Daß die 2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonylgruppe auch für den Schutz des Imidazolringsystems des Histidins verwendbar ist, wird durch die Darstellung des N^{α}-Z-N^{im}-TIP-Histidins gezeigt. Das nach der Methode von Eckstein[160] dargestellte N^{α}-Z-Histidin kann bei pH 9.5 mit Triisopropylbenzolsulfonylchlorid in das N-Imidazolgeschützte Derivat überführt werden. Die Verbindung läßt sich auf Grund des lipophilen TIP-Restes gut in organische Medien extrahieren und mit den üblichen Kupplungsreagenzien wie DCCI, DPPA und Chloameisensäureisobutylester problemlos als Kopfkomponente zu Peptidkupplungen heranziehen.

Name	Fp(°C)	R_f-Wert	$(\alpha)_D$(°)
Z-Arg(TIP)-OH	133	D 0.47	+3.9 (c=2, DMF)
BOC-Arg(TIP)-OH	147	D 0.46	+6.0 (c=2, DMF)
H-Arg(TIP)-OMe.HCl	74	D 0.58	+5.1 (c=2, DMF)
Z-His(TIP)-OH	118	D 0.53	+3.5 (c=2, DMF)

Tabelle 6: Physikalische Daten der dargestellten TIP-Derivate

Während die Tosyl-Schutzgruppe üblicherweise durch reduktive Methoden bzw. durch Fluorwasserstoff entfernt wird und durch acidolytische Abspaltungsmedien wie TFA oder

Chlorwasserstoff nicht und durch Bromwasserstoff in Essigsäure, Methansulfonsäure oder Trifluormethansulfonsäure nur partiell deblockiert wird, zeichnet sich die neue TIP-Schutzgruppe durch ihre relativ leichte Abspaltbarkeit aus. Ihre Entfernung ist analog der Mbs- und der Mts-Grup-

Tabelle 7: Abspaltungsbedingungen von N^{ω}-geschützten Argininderivaten bei Raumtemperatur[154]

Argininderivat	Agens	30 min (%)	60 min (%)
H-Arg(NO_2)-OH	MSA	19.3	25.3
H-Arg(Tos)-OH	MSA	40.7	43.1
H-Arg(Mbs)-OH	MSA	71.4	88.3[115]
"	MSA/TFA 9:1	60.1	84.7
"	TMSA/TFA 1:1	100	100
H-Arg(Mts)-OH	MSA	93.4	98.2
"	MSA/TFA 9:1	92.6	93.7
"	TMSA/TFA 1:1	100	100
H-Arg(TIP)-OH	MSA	95.3	100
"	MSA/TFA 9:1	96.0	98.0
"	TMSA	100	100
"	TFA	0	0
"	HBr/HAc	~25	-
"	HCl/HAc	0	0

Tabelle 8: Vergleich der ^{13}C-chemischen Verschiebungen von Arginin- und Histidinderivaten

Name	COOH	C_α	C_β	C_γ	C_δ	$C_{guan.}$	N^α-Schutz	N^ω-Schutz
Z-Arg(Mbs)-OH DCHA	174.85	55.52	29.91	25.75	-	156.98	65.21(CH_2)	55.52(OCH_3)
							155.61(CO)	161.14
	51.95						137.42	136.90
	29.26						128.38	128.38
	25.10	{DCHA}					127.60	113.76
	24.19							
Z-Arg(Mts)-OH DCHA	174.58	55.26	29.80	25.56	44.05	156.57	65.02(CH_2)	22.34(CH_3)
							155.36(CO)	20.22(CH_3)
	51.87						137.23	139.41
	29.13						130.93	139.11
	24.89	{DCHA}					128.20	136.87
	24.04						127.47	126.62
Z-Arg(Tos)-OH ($CDCl_3$)	173.90	53.85	28.25	25.90	40.55	156.90	65.70(CH_2)	21.05(CH_3)
							137.15	142.00
							128.50	141.25
							127.85	129.25
								125.80
Z-Arg(TIP)-OH	175.91	55.19	28.36	23.76	49.05	155.96	65.19(CH_2)	23.47(CH_3)
							137.09	24.61(CH_3)
							128.22	29.89(CH)
							127.54	33.25(CH)

BOC-Arg(TIP)-OH ($CDCl_3$)	-	55.29	30.07	25.46	-	156.42	29.16(CH_3) 79.99 156.42(CO)	23.63(CH_3) 24.81(CH_3) 28.38(CH) 34.04(CH) 123.28 137.64 148.89 151.16

Name	COOH	C_α	C_β	C_{im}	N^α-Schutzgr.	N^{im}-Schutzgr.
Z-His(Mbs)-OH	173.14	52.36	29.49	115.34 136.96	65.13(CH_2) 156.02(CO) 137.00 128.37 127.74 127.57	55.99(OCH_3) 164.32 140.48 129.70
Z-His(TIP)-OH CHA	173.60 49.23 24.65 {CHA} 27.95	54.63	28.97	117.33 133.15 134.51	65.10(CH_2) 155.62(CO) 124.56 127.50 128.20 141.51 151.07	23.68(CH_3) 24.65(CH_3) 30.23(CH) 33.13(CH) 146.80 121.31

7.5 Die m-Trifluormethylbenzolsulfonyl(TMbs)-Schutzgruppe

Als weitere Schutzgruppe vom Sulfonamidtyp soll in dieser Arbeit die m-Trifluormethylbenzolsulfonylgruppe vorgestellt werden. Die Einführung in das N^{α}-Z-geschützte Arginin gelingt mit m-Trifluormethylbenzolsulfonylchlorid in analoger Weise wie bei der im Kapitel zuvor dargestellten TIP-Verbindung. Da sich die so synthetisierten Verbindungen wegen ihres Schwefelgehaltes einer Hydrierung zum Zwecke der Z-Gruppenabspaltung entziehen, wird die Z-Schutzgruppe durch dünnschichtchromatographisch verfolgte Abspaltung mit Hilfe von 20 %igem Bromwasserstoff in Essigsäure vorgenommen. Die so entacylierte Verbindung läßt sich dann mit BOC-Azid in das N^{α}-BOC-N^{ω}-TMbs-Arginin überführen.

Wie im vorhergegangenen Kapitel wird auch hier die Verwendbarkeit dieses Restes als Imidazolschutzgruppe überprüft. Die Einführung des m-Trifluormethylbenzolsulfonylrestes war auch in diesem Falle möglich. Man erhält ein stabiles N^{α}-Z-N^{im}-TMbs-Histidin.Die Abspaltungsbedingungen dieser Verbindungen sind praktisch dieselben wie bei den zuvor beschriebenen TIP-Verbindungen.

Die Anwendung der 2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonylderivate des Arginins wird im anschließenden Kapitel anhand zweier Peptidsynthesen dokumentiert.

Tabelle 9: Physikalische Daten von TMbs-Derivaten

Name	Fp(^{o}C)	R_f-Wert	$\{\alpha\}_D^{18}$
TMbs-Glycin	146	0.21 (D)	-
TMbs-β-Alanin	100	0.31 (D)	-
Z-Arg(TMbs)-OH	148 (Z.)	0.40 (D)	$+7.6^{o}$(c=1, DMF)
Z-His(TMbs)-OH	143	0.50 (D)	-14.4^{o}(c=2, DMF)

Tabelle 10: ^{13}C-chemische Verschiebungen von TMbs-Derivaten

Aminosäureteil

Name	COOH	C_α	C_β	C_γ	C_δ	C_g
Z-Arg(TMbs)-OH	178.30	55.24	29.95	25.29	45.75	156.42

Schutzgruppenteil

Nα-Schutzgr.	N^{ω}-Schutzgr.
65.25(CH_2)	63.88(CF_3)
137.15	145.79
128.45	130.27
128.22	129.53
127.00	121.97

Aminosäureteil

Name	COOH	C_α	C_β	C_{im}
Z-His(TMbs)-OH	175.54	54.64	30.99	114.63
				131.40
				137.12

Schutzgruppenteil

N^{α}-Schutzgr.	N^{im}-Schutzgr.
65.11(CH_2)	142.32
155.71(CO)	123.86
138.62	131.86
128.35	
127.50	
125.16	

8. Synthese des Decapeptidamids Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-γ-Abu-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2

Durch die Substitution der γ-Aminobuttersäure für Glycin[6] mit ihren drei CH_2-Gruppen wird der aliphatische Teil des LH/FSH-Releasinghormons noch weiter von dem N-terminalen aromatischen Teil des Peptides getrennt als es bei den β-Alanin-substituierten Derivaten der Fall ist.

Der Aufbau dieses Decapeptidamids erfolgt vom C-terminalen Ende her. Durch DCCI-Kupplung von Z-Prolin mit Glycinmethylester ist das Dipeptid Z-Pro-Gly-OMe zugänglich. Nach Abspaltung der Z-Schutzgruppe mit Wasserstoff und Palladium/Aktivkohle als Katalysator wird mit dem neuentwickelten Derivat Z-Arg(TIP)-OH zum Tripeptid verlängert und mit Ammoniak in Methanol bei 0^{o} C in das geschützte Tripeptid überführt. Die nachfolgende Abhydrierung der Z-Schutzgruppe erfolgt hier interessanterweise problemlos, obwohl das Molekül eine schwefelhaltige Schutzgruppe trägt. Die Fragmentkupplungsmethode der vorhergegangenen Synthesen beibehaltend, wird die so erhaltene Aminokomponente mit BOC-γ-Abu-Leu-OH, das durch DCCI/HOBt-Kupplung von BOC-γ-Abu-OH und H-Leu-OMe und anschließender Verseifung in guten Ausbeuten zugänglich ist, zum gewünschten Pentapeptid gekuppelt. Nach Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit Chlorwasserstoff/Essigsäure erhält man mit dem Dipeptid BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH das Heptapeptidamid BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-γ-

Abu-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2. Der weitere Aufbau zum Octapeptid erfolgt nach Entacylierung mit dem Aktivester BOC-Tryptophan-2.4.5-trichlorphenylester, dem nach Schutzgruppenabspaltung unter Stickstoff mit Ethandithiol als Kationenfänger, die Verlängerung zum Decapeptid mit dem geschützten Dipeptid Z-Pyr-His-OH folgt. Die Deblockierung der verbliebenen Schutzgruppen wird wie bei den vorhergegangenen Synthesen in flüssigem, mit CoF_3 getrocknetem Fluorwasserstoff vorgenommen. Die Endreinigung des Peptids erfolgt durch Verteilungschromatographie an Sephadex G 25 und anschließender Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose mit Ammoniumacetat als Puffer.

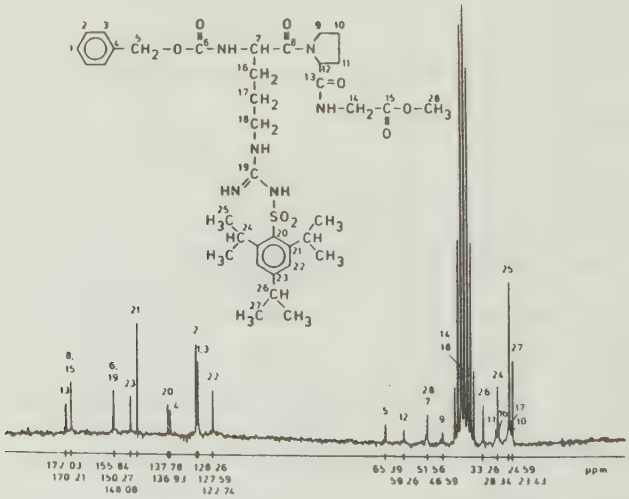


Abbildung 43: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Arg(TIP)-Pro-Gly-OMe, 220 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 30 808 Pulsinterferogr., 20.115 MHz, protonenbreitbandentk.

8.1 Synthese von Tuftsin

Das aus der γ-Globulinfraktion PC IV, erhältlich aus der Cohn II-Fraktion, isolierte phagocytosestimulierende Peptid Tuftsin, soll hier als weiteres Beispiel für den Einsatz des N^{ω}-Triisopropylbenzolsulfonyl-geschützten Arginins dienen. Tuftsin ist ein stark basisches, hygroskopisches Tetrapeptid mit der Sequenz

Thr-Lys-Pro-Arg[161]

Die Synthesestrategie wird so angelegt, daß eine Fragmentkupplung 2+2 möglich wird. Das N^{α}-Z-N^{ω}-(TIP)-Arginin, das hier als C-terminale Aminosäure am Carboxylende geschützt werden muß, wird wie oben erwähnt, nach der Methode von Weber[159] in den geschützten Methylester überführt; nach Abhydrierung der Z-Schutzgruppe, wird mit BOC-Prolin in einer DCCI/HOBt-Kupplung zum Dipeptid gekuppelt. Das N-terminale Fragment erhält man durch Verknüpfung von BOC-Thr(Bzl)-OH mit N^{ε}-Z-Lysinmethylester und nachfolgender Verseifung des Dipeptids. Nach BOC-Gruppenabspaltung von BOC-Pro-Arg(TIP)-OMe können die beiden Dipeptide unter DCCI/HOBt-Bedingungen zum geschützten Tetrapeptid gekuppelt werden. Die nachfolgende Verseifung des Tetrapeptidesters mit 1 N Natriumhydroxid in Methanol gestaltet sich problemlos. Die verbliebenen Schutzgruppen werden mit flüssigem Fluorwasserstoff entfernt. Das so erhaltene Rohpeptid wird durch Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose mit einem Ammoniumacetatgradienten, sowie an DOWEX X 4 mit einem Pyridinacetatgradienten gereinigt. Die erhaltene Verbin-

dung zeigt eine korrekte Aminosäureanalyse und stimmt mit den in der Literatur[162] gemachten Angaben ihrer physikalischen Daten überein.

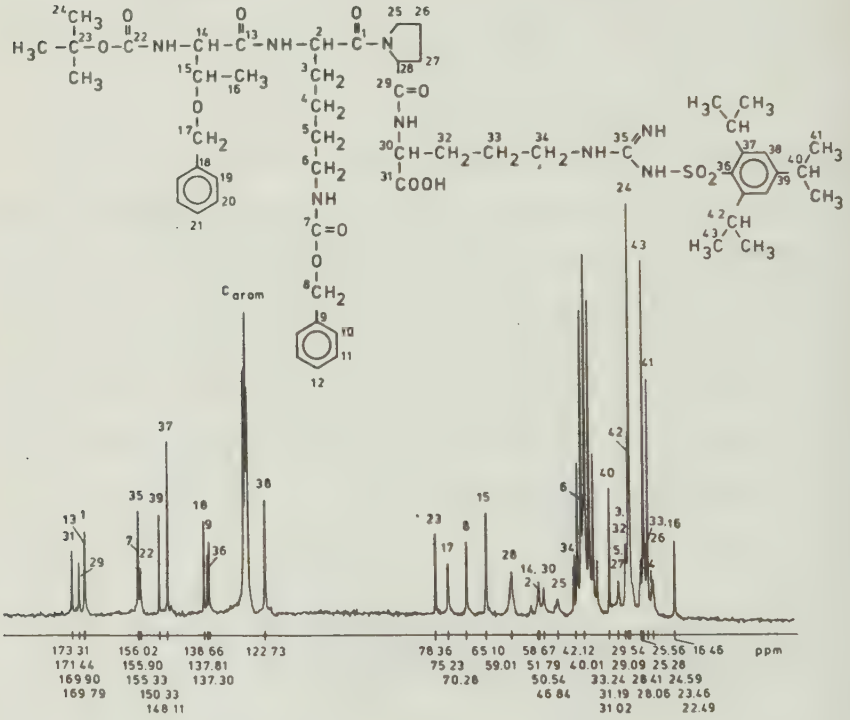


Abb.44: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Thr(Bzl)-Lys(Z)-Pro-Arg (TIP)-OH, 150 mg, 20.115 MHz, 82 000 Pulsinterferogramme, protonenbreitbandentkoppelt, DMSO-d_6.

Weitere Anwendungsbeispiele für die Verwendung von TIP-geschützten Verbindungen werden bei den in einem späteren Kapitel abgehandelten Enkephalinsynthesen aufgeführt.

9. Die Entwicklung neuer Kupplungsreagenzien

9.1 Allgemeines

Lipmann[163] vermutete schon 1941, daß bei der Proteinbiosynthese gemischte Aminosäure-Phosphorsäure-Anhydride als reaktive Zwischenstufen auftreten können. Diese Idee führte in der Folge zur Entwicklung einer Vielzahl von phosphorhaltigen Reagenzien, die alle eine biomimetische Peptidkupplung zum Ziele hatten. Die ersten erfolgreichen Ergebnisse wurden mit den gemischten Anhydriden von O-Alkyl- bzw. O-Arylphosphorsäure und der entsprechenden N-geschützten Aminosäure erzielt. In der Folge wurden auch die Anhydride von Phosphorigen Säuren (Phosphit-Methode) zu Kupplungen herangezogen. Die Weiterentwicklung führte über die Phosphoroxidchlorid-Methode, Phosphorazo-Methode über das Mitin-[164] schließlich zum Mukaiyama-Verfahren[165] der Oxidations-Reduktions-Kondensations-Methode.

Daß auch "Onium-Salze" von phosphorhaltigen polaren aprotischen Lösungsmitteln, die als vielseitige und reaktive Zwischenprodukte in der organischen Chemie schon längere Zeit bekannt sind, als Peptidsynthesereagenzien verwendet werden können, ist das Verdienst von Kenner[166].

Setzt man p-Toluolsulfonsäureanhydrid mit einem Überschuß von Hexamethylphosphorsäuretrisamid um, so erhält man über das Acyloxyphosphoniumsalz 1, das Ditosylat 2, das bei tie-

fen Temperaturen mit einer N-Acylaminosäure zum N-Acyl-aminoacyloxy-phosphoniumsalz 3 reagiert; durch Zugabe der Aminokomponente reagiert dieses dann unter Ausbildung der Amidbindung zum Peptid.

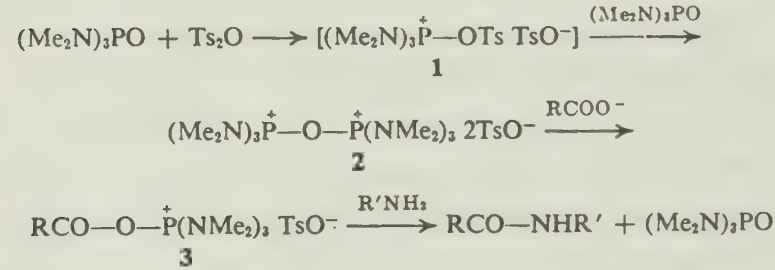


Abb. 45: Mechanismus der Peptidkupplung nach der Methode von Kenner [166].

Das von Castro[167,168] verwendete System Tris(dimethylamino)-phosphin/CCl_4 sollte ebenfalls wie früher angenommen wurde, über die Ausbildung eines Acyloxy-tris(dimethylamino)phosphoniumsalzes führen, das mit einem weiteren Mol N-Acyl-aminosäure das symmetrische Anhydrid als aktive Komponente ausbilden sollte und unter Zugabe von Aminokomponente zum Peptid reagieren sollte. Neuere Untersuchungen[172], die vor allem auf ^{31}P-NMR-Untersuchungen beruhen, widerlegen den angenommenen Mechanismus. Neben Chlor-tris(dimethylamino)-phosphoniumchlorid konnte ausschließlich Hexamethylphosphorsäuretrisamid aber keine Acyloxyphosphoniumverbindung

nachgewiesen werden.

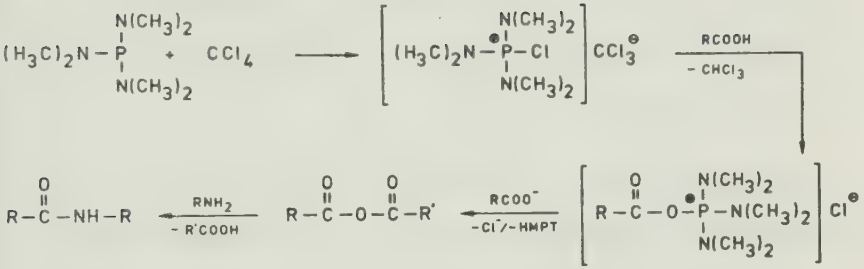


Abb. 46: Mechanismus der Castro-Methode

Auf Grund der Instabilität der eingesetzten Verbindungen und der mäßigen Peptidausbeuten (54-68 %) die erzielt wurden, konnte sich die Methode nicht durchsetzen. Zudem waren, neben teilweise starker Racemisierung, auch Nebenreaktionen wie 58 %ige Cyanalaninbildung bei der Kupplung von Z-Asn-OH mit H-Gly-OEt zu beobachten [168].

Die Weiterentwicklung dieser Verbindungen durch Castro [169], führte schließlich zum BOP-Reagenz, dem die Idee zu Grunde lag, das Chlor in der oben aufgeführten Verbindung Chlor-tris(dimethylamino)phosphoniumchlorid gegen den Racemisierungssuppressor 1-Hydroxybenzotriazol zu substituieren.

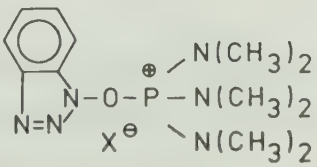


Abb. 47: Struktur des BOP-Reagenzes

Dieses Reagenz reagiert mit der N-Acylaminosäure unter Ausbildung eines Aktivesters, der mit der Aminokomponente unter Ausbildung einer Amidbindung, zum Peptid führt. Auch hier waren Nebenreaktionen und teilweise Racematbildung zu beobachten.

Um diese Nachteile des BOP-Reagenzes auszuschalten, werden in dieser Arbeit neue, modifizierte Reagenzien entwickelt, in denen der HOBt-Rest durch andere racemisierungsunterdrückende Reste ersetzt wird. Die so erhaltenen Kupplungsreagenzien werden an Sequenzen den LH/FSH-Releasinghormons auf ihre Ausbeuten und Racemisierung getestet.

9.2 Synthese von Succinimido-N-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorphosphat (SOP-Reagenz)

Die Synthese der Succinimido-N-Oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium-Verbindung kann auf zwei Wegen vorgenommen werden, wie sie in neuerer Zeit für das BOP-Reagenz entwickelt wurden[170,171]. Ausgangsverbindung beider Synthesewege ist das oft als Lösungsmittel verwendete Hexamethylphosphorsäuretrisamid, das mit den Lewissäuren Phosgen bzw. Phosphoroxichlorid umgesetzt werden kann. Dabei entstehen intermediär, die bei dem oben aufgeführten Mechanismus angenommenen, aber nicht existenten Acyloxyphosphoniumionen. Diese konnten hier durch ^{31}P-NMR-Spektroskopie von Poignant[173] als auch von Teichman[172] nachgewiesen werden. Nach Poignant muß für diese Reaktion folgender Mechanismus angenommen werden:

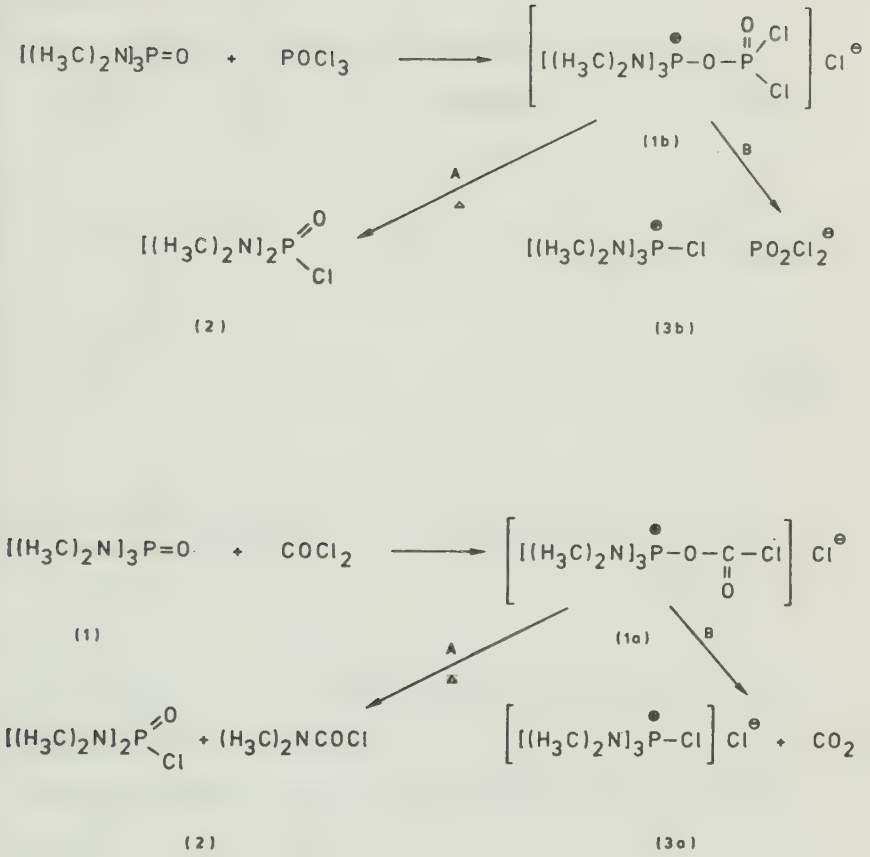


Abb. 48: Angenommener Mechanismus der Umsetzung von Hexamethylphosphorsäuretrisamid mit Phosgen bzw. Phosphoroxichlorid

Die aus diesen Acylphosphoniumionen entstehenden Verbindungen 3 a bzw. 3 b lassen sich in der Kälte mit N-Hydroxysuccinimid, in Gegenwart von Triethylamin als Base, zum Succinimido-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphoniumchlorid umsetzen. Um diese Substanz stabiler und besser kristallisierbar zu machen, wird das Chlorid mit KPF_6 gegen das Hexafluorphosphat ausgetauscht.

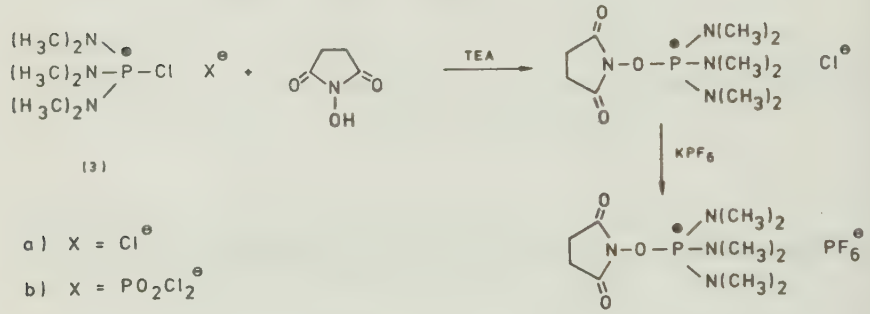
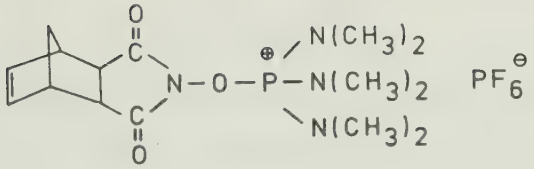


Abb. 49: Synthese des SOP-Reagenzes

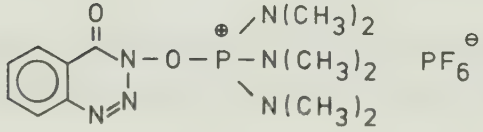
9.3 Weitere Kupplungsreagenzien vom Typ des BOP-Reagenz

In analoger Weise werden nach diesen Methoden die neuen Kupplungsreagenzien:

5-Norbornen-2.3-dicarbonsäureimido-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorphosphat (NOP-Reagenz)

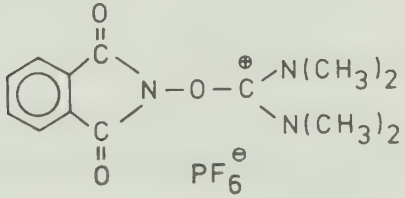


4-Oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazino-3-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorphosphat (BOOP-Reagenz)



sowie

Phtalimido-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorphosphat (PhOP-Reagenz)



synthetisiert, bei denen der N-Oxy-succinimidorest[174] gegen die die Racemisierung unterdrückenden Reste N-Oxy-5-norbornendicarbonsäureimid[175], 3-Oxy-4-oxo-3.4-dihydro-

1.2.3-benzotriazin[176] und N-Oxy-phtalimido[177] ausgetauscht sind.

Die mit diesen Reagenzien durchgeführten Kupplungen an Sequenzen des LH/FSH-Releasinghormons sowie am Modellpeptid Z-Val-Gly-OEt und deren Ausbeuten werden in der folgenden Tabelle mit den Ausbeuten der durch DPPA-, DCCI/HOBt- bzw. Mixed-Anhydrid-Kupplung gewonnenen Verbindungen verglichen; wobei die erzielten Ausbeuten mit den neuen Kupplungsreagenzien durchaus mit denen der "klassischen" Methoden vergleichbar sind.

9.4 Kupplungsreagenzien auf der Basis von O-Benzotriazolyl-N.N'-tetramethylharnstoffsalzen

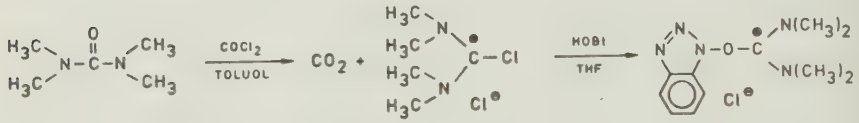
Den Acylphosphonium-Verbindungen vergleichbar sind die durch Reaktion von tertiären Amiden mit Lewissäuren erhaltenen Iminiumsalze. Diese sogenannten Vielsmeier-Hack-Reagenzien, wie z. B. Chlormethylendimethylammoniumchlorid $\{Me_2N{=}CHX\}^+X^-$, das durch Reaktion von Dimethylformamid und Phosphorpentachlorid erhalten wird, sind vielgebrauchte Formylierungsreagenzien[178]. Vielsmeier-Hack-Verbindungen machen auch Alkylhalogenide aus Alkoholen zugänglich[179], wobei intermediär Alkoxymethylenammoniumsalze als Zwischenprodukte auftreten.

Auf der Basis dieser Salze erhielt so Dourtoglou[180] aus der

Peptid	SOP	NOP	BOOP	PhOP	BOP	DPPA	DCCI/ HOBt	MA
Z-Pro-Gly-OMe	37.46[b]	49.95[c]	49.90[a]	56.19[c]	56.18[c]	43.70[c]	74.91[b]	93.60[c]
BOC-Gly-Leu-OMe	79.37[c]	59.52[c]	92.59[c]	76.05[c]	96.00[c]	82.67[c]	88.30[b]	69.44[c]
BOC-Ser(Bzl)-Tyr (Bzl)-OMe	71.09[c]	44.43[c]	53.32[a]	58.65[c]	40.00[c]	53.31[c]	77.51[b]	57.76[c]
BOC-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OMe	-	-	-	66.56[c]	-	-	-	-
BOC-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-OMe	71.98[c]	-	-	-	-	-	-	-
BOC-Ser(Bzl)-Tyr (Bzl)-Gly-Leu-OMe	-	-	85.96[b]					
Z-Val-Gly-OEt	71.34[c]	65.40[c]	69.86[c]	86.20[c]	71.34[c]	86.30[c]	59.37[b]	80.20[c]
BOC-His(ZTE)-Trp-Ser(Bzl)-OMe	-	41.72[b]	-	-	-	-	-	-

Tabelle 11: Peptidkupplungen mit neuentwickelten Reagenzien vom BOP-Typ (Ausbeuteangaben in % nach Aufarbeitung und Umkristallisation). Kupplung: a) in Acetonitril, b) in Dimethylformamid, c) in Methylenchlorid, bei Tri- und Tetrapeptiden sind die Kupplungsstellen unterstrichen.

aus Tetramethylharnstoff (1) gewonnen Vielsmeier-Hack-Verbindung (2) durch Umsatz mit 1-Hyroxybenzotriazol als Alkoholkomponente, O-Benzotriazolyl-N.N'-tetramethyluroniumchlorid (3), das sich als Reagenz zur Peptidknüpfung verwenden läßt.

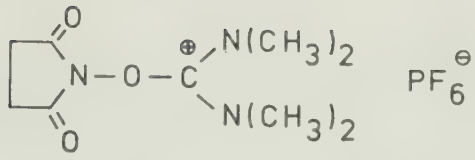


(1) (2) (3)

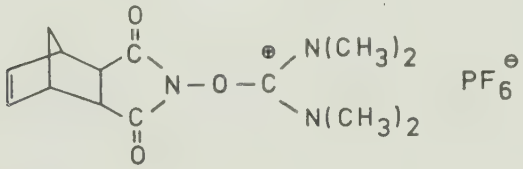
Abb. 50: Synthese des HBTU-Reagenz[180]

Dieses HBTU-Reagenz zeichnet sich durch gute Kupplungseigenschaften aus. Die Kupplungszeiten liegen im allgemeinen bei etwa 15-30 min, die Ausbeuten bis zu 90 %. Der Nachteil ist in der teilweisen Racemisierung der Produkte zu sehen. Um diesen Nachteil zu eliminieren wurde in dieser Arbeit der O-Benzotriazolylrest durch andere die Racemisierung unterdrückende Reste ersetzt, wobei hier N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxy-5-norbornen-2.3-dicarbonsäureimid und N-Hydroxyphtalimid als Alkoholkomponente Verwendung finden. Man erhält so die neuen Kupplungsreagenzien:

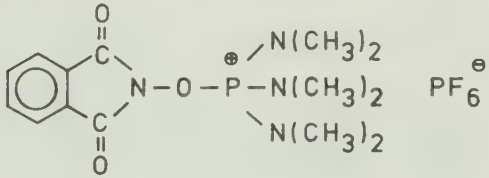
O-(N-oxysuccinimido)-N.N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat (STU-Reagenz)



O-(N-oxy-5-norbornen-2.3-dicarbonsäureimido)-N.N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat (NTU-Reagenz)



O-(N-oxy-phtalimido)-N.N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat (PhTU-Reagenz)



Die mit diesen Reagenzien erzielten ausbeuten werden in Tabelle 12 mit den durch DPPA-, DCCI/HOBt und Mixed-Anhydrid-Verfahren erzielten Ausbeuten verglichen.

Peptide	STU	NTU	PhTU	HBTU	DPPA	DCCI/ HOBt	MA
Z-Pro-Gly-OMe	59.30[a]	65.55[c]	65.50[c]	71.80[c]	43.70[c]	74.91[b]	93.60[c]
BOC-Gly-Leu-OMe	85.98[a]	79.37[c]	92.59[c]	79.37[c]	82.67[c]	88.30[b]	69.44[c]
BOC-Ser(Bzl)-Tyr (Bzl)-OMe	67.54[a]	76.42[b]	69.89[d]	73.28[d]	53.31[d]	77.51[b]	57.76[c]
Z-Val-Gly-OEt	78.25[c]	82.31[c]	80.26[b]	80.26[b]	86.30[d]	59.37[b]	80.20[c]
BOC-Ser(Bzl)-Tyr (Bzl)-Gly-Leu-OMe	90.06[b]	-	-	-	-	-	-
BOC-Gly-Leu-Arg (Mbs)-Pro-Gly-NH_2	-	65.11[b]	-	-	-	-	-
BOC-His(ZTE)-Trp-OBzl	-	86.41[c]	84.36[c]	-	-	-	-
Z-His(TMbs)-Trp-OBzl	-	-	-	52.99[c]	-	-	-

Tabelle 12: Peptidkupplungen mit neuentwickelten Reagenzien vom HBTU-Typ (Ausbeuten in % nach Aufarbeitung und Umkristallisation). Kupplungen: a) in Acetonitril, b) in Dimethylformamid, c) in Methylenchlorid, d) in Methylenchlorid/DMF (3:1), bei Tri- bzw. Tetrapeptiden sind die Kupplungsstellen unterstrichen.

9.5 Racemattest

Um zu überprüfen, ob die mit den neuen Kupplungsreagenzien synthetisierten Peptide den Ansprüchen an die optische Reinheit genügen, werden diese einem Racemattest unterworfen. Verwendung findet hierbei ein Verfahren zur gaschromatographischen Enantiomerentrennung von Aminosäuren, das in letzter Zeit von E.Bayer et al.[181,182] entwickelt wurde. Als thermisch stabile Phase wird "Chirasil-Val", ein durch Copolymerisation von Dimethylsiloxan und Carboxyalkylsiloxan und anschließender Kupplung mit Valin-tert.-butylamid erhaltenes Produkt, verwendet. Die zu trennenden Aminosäuren müssen nach Hydrolyse des Peptids durch Veresterung der Carboxylgruppe mit Propanol-(2) und zusätzlicher Trifluoracetylierung der Aminogruppe, derivatisiert werden.

Eine Auswahl der gemessenen Peptide ist aus den folgenden Tabellen ersichtlich. Sowohl die durch die Acyloxyphosphonium-Kupplungsreagenzien als auch die mit den Alkyloxyuronium-Verbindungen hergestellten Peptide werden mit denen durch DPPA-, DCCI/HOBt- und Misch-Anhydrid-Kupplung gewonnenen verglichen. Der Anteil an D-Aminosäuren ist im Falle der Phosphonium-Verbindungen für die aliphatischen Aminosäuren wie Prolin, Valin, Leucin und Serin im Vergleich zu den klassischen Kupplungsmethoden etwa gleich groß, nur der Anteil an D-Enantiomer ist im Falle des Ty-

Peptide	SOP	NOP	BOOP	PhOP	BOP	DPPA	DCCI/ HOBt	MA
Z-Pro-Gly-OMe	Pro 2.0	Pro 2.1	Pro 2.3	Pro 2.4	Pro 3.7	Pro 2.8	Pro 2.6	Pro 2.6
BOC-Ser(Bzl)-Tyr (Bzl)-OMe	Ser 0.3 Tyr 2.1	Ser 0.28 Tyr 2.0	Ser 0.29 Tyr 2.5	Ser <1.0 Tyr 6.6	Ser <0.2 Tyr 0.9	Ser 0.24 Tyr 2.5	Ser <0.2 Tyr 1.0	Ser <1.0 Tyr 1.2
BOC-Gly-Leu-OMe	Leu 0.5	Leu 1.8	Leu -	Leu -	Leu 1.5	Leu 1.5	Leu 1.5	Leu 1.6
Z-Val-Gly-OEt	Val 0.49	Val 0.41	Val -	Val -	Val 0.35	Val 0.26	Val 0.30	Val 0.27
BOC-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-OMe	Tyr 3.6 Leu 0.45	-	-	-	-	-	-	-
BOC-Ser(Bzl)-Tyr (Bzl)-Gly-Leu-OMe	Ser 3.66 Tyr 3.9 Leu 1,22	-	-	Ser 3.8 Tyr 3.0 Leu 5.4	-	-	-	-
BOC-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OMe	-	-	-	Tyr 3.1	-	-	-	-

Tabelle 13: Racemattest von Acyloxyphosphonium-Kupplungsreagenzien im Vergleich mit DPPA-, DCCI/HOBt- und Mixed-Anhydrid-Kupplungen (gemessene Anteile an D-Aminosäuren in %).

Peptide	STU	NTU	PhTU	HBTU	DPPA	DCCI/ HOBt	MA
Z-Pro-Gly-OMe	Pro 2.1	Pro 1.8	Pro -	Pro 2.0	Pro 2.78	Pro 2.6	Pro 2.64
BOC-Gly-Leu-OMe	Leu 1.6	Leu 1.36	Leu 1.40	Leu 1.40	Leu 1.57	Leu 1.51	Leu 1.55
BOC-Ser(Bzl)-Tyr (Bzl)-OMe	Ser 0.93 Tyr 3.97	Ser 1.35 Tyr 6.1	Ser 0.95 Tyr 7.0	- - -	Ser 0.24 Tyr 2.47	Ser <0.2 Tyr 1.04	Ser <1.0 Tyr 1.24
Z-Val-Gly-OEt	Val 0.55	Val 0.52	Val 0.42	Val 0.5	Val 0.26	Val 0.30	Val 0.27
BOC-Ser(Bzl)-Tyr (Bzl)-Gly-Leu-OMe	Ser 2.58 Tyr 9.7 Leu 0.98	-	-	-	-	-	-
BOC-Gly-Leu-Arg (Mbs)-Pro-Gly-NH_2	Leu 3.1 Arg 1.76 Pro 2.41	-	-	-	-	-	-

Tabelle 14: Racemattest der durch N-Oxyalkyluronium-Kupplungsreagenzien dargestellten Peptide im Vergleich mit den "klassischen"-Kupplungsreagenzien (gemessene Anteile an D-Aminosäuren in %)

rosins bei den Phosphonium-Verbindungen etwas schlechter. Dies muß aber nicht unbedingt auf die Kupplungsbedingungen zurückzuführen sein. Eine Abhängigkeit von den bei den Kupplungen verwendeten Lösungsmitteln kann festgestellt werden. Die Uronium-Verknüpfungsreagenzien zeigen im Gegensatz dazu, wiederum in Vergleich zu den klassischen Kupplungsmethoden, etwas höhere Anteile an D-Enantiomeren. Vergleicht man die Werte der Phosphonium-Verbindungen mit denen der Uronium-Kupplungsreagenzien, so schneiden die phosphorhaltigen Derivate besser ab.

Stellt man die so erhaltenen Ergebnisse den von Dourtoglou[180] publizierten Werten gegenüber, so kann festgestellt werden, daß die neuen Kupplungsreagenzien in keinem Falle so starke Racemisierung verursachen wie die von diesem Autor für das O-Benzotriazolyl-N.N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat erhaltenen Daten.

Methode	Ausbeuten	% D,L*	Reaktionsdauer	Reaktionstemperatur
Azidkuppl.[183]	67-87	12- 0	> 24 h	0°C
DCCI-Kuppl.[183]	7o-84	84-46	23 h	0°C
Nitrophenylester-Kuppl[183]	84-95	25- 0	24 h	RT
Mixed-Anhydrid	85-88	82-78	24 h	-5-RT
Itoh[184]	95	75	2.5 h	24°C
BOP-K.[185]	68-92	60	15-90 min	24°C
HBTU-K.[180]	90-96	39-25	15 min	24°C

Tabelle 15: Vergleich verschiedener Kupplungsmethoden nach Dourtoglou[180]
* = Racemattest nach Young

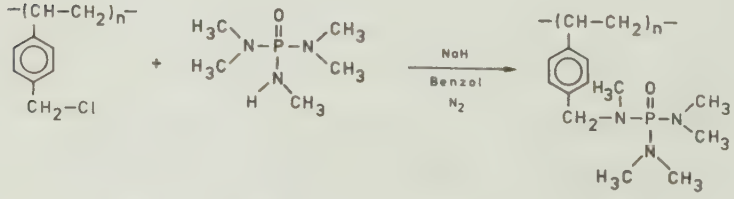
9.6 Polymere Kupplungsreagenzien

Die Verwendung polymerer Reagenzien hat in den letzten Jahren eine starke Entwicklung erfahren. So wurden polymergebundene Katalysatoren, spezifische polymere Absorbentien für biologisch aktive Verbindungen und für Metallionen, polymere Transfer-Verbindungen und polymere Trägermedien für die Peptid- und andere organische Synthesen entwickelt.[238,239]. Die Zahl der polymergebundenen Kupplungsreagenzien zum Zwecke der Darstellung von Carbonsäureamiden und Estern ist dagegen sehr klein geblieben; so wurden nur die Synthesen von polymergebundenen Carbodiimiden[240,241,242], sowie von Polymer-N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1.2-dihydrochinolin (EEDQ)[243] literaturbekannt. Auf der Basis löslicher polymerer Kupplungsreagenzien

wurde von M. Mutter[244] polyethylenglycolgebundenes Diisopropyl-carbodiimid synthetisiert.

9.6.1 Polymere Kupplungsreagenzien auf der Basis von polymerem "HMPT"

Das extrem polare aprotische Hexamethylphosphorsäure-trisamid wird viel zu nucleophilen Verdrängungsreaktionen sowie bei Reaktionen mit Carbanionen eingesetzt. Auf Grund seiner Kanzerogenität, seines teuren Preises als auch seiner nicht immer einfachen Entfernbarkeit aus dem Reaktionsmedium, wurden in neuerer Zeit mehrere Synthesen publiziert, die die Immobilisierung von Hexamethylphosphorsäuretrisamid zum Inhalt haben[245,246,247,248]. Dieses polymere "Hexamethylphosphorsäuretrisamid" wird im allgemeinen durch Umsatz von chlormethyliertem Polystyrol, vernetzt mit Divinylbenzol, mit dem Natriumsalz des Pentamethylphosphorsäuretrisamids unter Stickstoffatmosphäre dargestellt.



Die so gewonnenen Polymere, die Beladungsgrade von 80-90 % aufweisen, lassen sich, wie Versuche ergeben haben, als

Phasentransferkatalysatoren verwenden und sind Ausgangsmaterial für die Synthese von Kupplungsreagenzien auf der Basis von Castro's BOP-Reagenz[169]. Durch Umsatz des polymeren "HMPT" mit Phosgen zur Chlor-bis(dimethylamino)((methyl-p-polystyrylmethyl)amino)phosphoniumchlorid-Verbindung, die sich mit 1-Hydroxybenzotriazol, unter Zusatz von Triethylamin, zum polymeren "BOP-Reagen" umsetzen läßt. In Analogie zum klassischen Reagenz läßt sich dies auch mit N-Hydroxysuccinimid praktizieren.

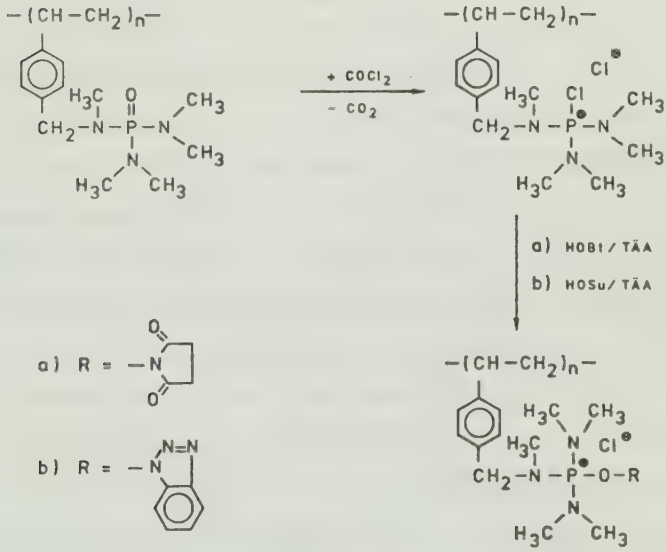


Abbildung 51: Synthese von polymerem BOP- bzw. SOP-Reagenz

Für die so gewonnenen polymeren Verknüpfungsreagenzien errechnet sich ein Beladungsgrad von 25.3 bzw. 28.5 % an Hydroxybenzotriazol bzw. Hydroxysuccinimid. Als Testkupplung wird die Verknüpfung von Z-Valin mit Glycinethylester gewählt, das mit diesen Reagenzien in 20.73 bzw. 25 % Ausbeute zum Dipeptidester Z-Val-Gly-OEt gekuppelt werden kann.

9.6.2 Polymere Kupplungsreagenzien auf der Basis von polymerem "Tetramethylharnstoff"

In Analogie zu den oben beschriebenen Polymeren, wird ausgehend von chlormethyliertem Merrifield-Harz, das mit Trimethylharnstoff-Natrium- bzw. Lithium-Salz, das aus Trimethylharnstoff und Natriumhydrid bzw. n-Butyl-lithium unter Stickstoffatmosphäre hergestellt wird, umgesetzt. Man erhält so einen polymeren "Tetramethylharnstoff", der nach Versetzen mit Phosgen eine polymere Vielsmeier-Hack-Verbindung ergibt, die durch Umsatz mit 1-Hydroxybenzotriazol bzw. N-Hydroxysuccinimid, das entsprechende O-benzotriazolyl-N-Alkyluronium-Polymer bzw. O-Succinimido-N-Alkyluronium-Polymer ergibt, wobei die Beladung für die Harnstoff-Polymeren zwischen 90-97 %, die der Uronium-Verbindungen bei 30 % liegt. Als Modellpeptid dient wiederum Z-Val-Gly-OEt, das aus diesen Verbindungen in 30-40 % Ausbeute zugänglich ist bei äquimolarem Einsatz der Komponenten in Dimethylformamid als Lösungsmittel.

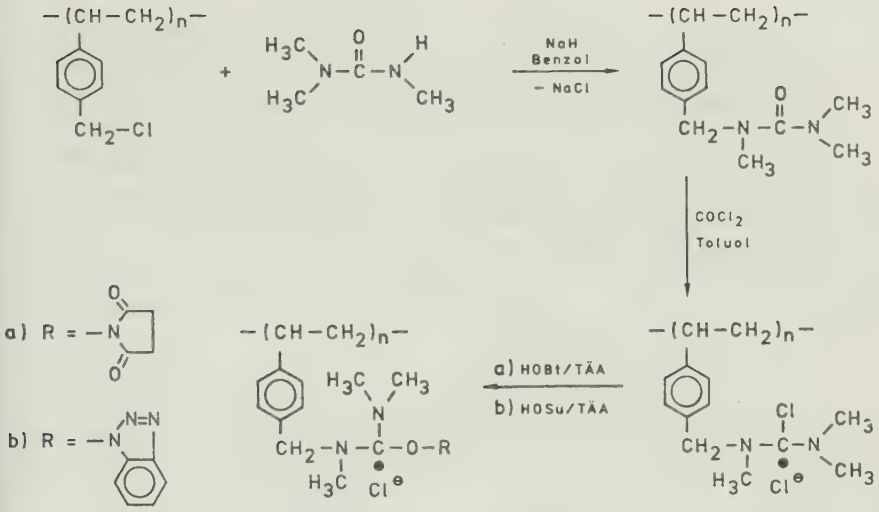


Abb. 52: Synthese von polymerem HBTU- bzw. STU-Reagenz

10. Synthese von Enkephalinderivaten

Die klassische Synthese der analgetisch wirksamen Enkephaline stößt immer wieder auf große Schwierigkeiten. Deshalb werden für diese biologisch aktiven Peptide, unter Anwendung der im vorigen Abschnitt neuentwickelten Kupplungsreagenzien, neue Synthesestrategien entwickelt.

10.1 Synthese des Leucin-Enkephalins

Der Aufbau dieses Pentapeptids wird in der Weise vorgenommen, daß am C-Terminus als Leucinderivat Leucin-tert.-butylester eingesetzt wird. Bedingt durch die Säurelabilität von Aminosäure-tert.-butylestern kann als Aminoschutz-

gruppe für das dem Leucin folgende Phenylalanin nur eine hydrogenolytisch oder basisch abspaltbarer Acylrest verwendet werden. In dieser Synthese wird der basisch, durch β-Eliminierung, entfernbare Fluorenylmethyl-oxycarbonyl (FMOC)-Rest[186] verwendet.

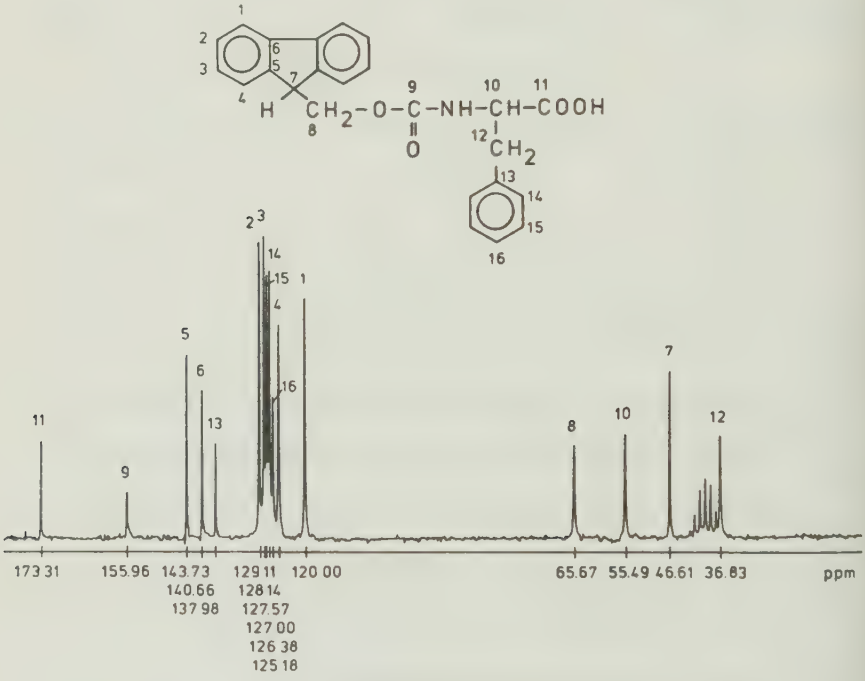
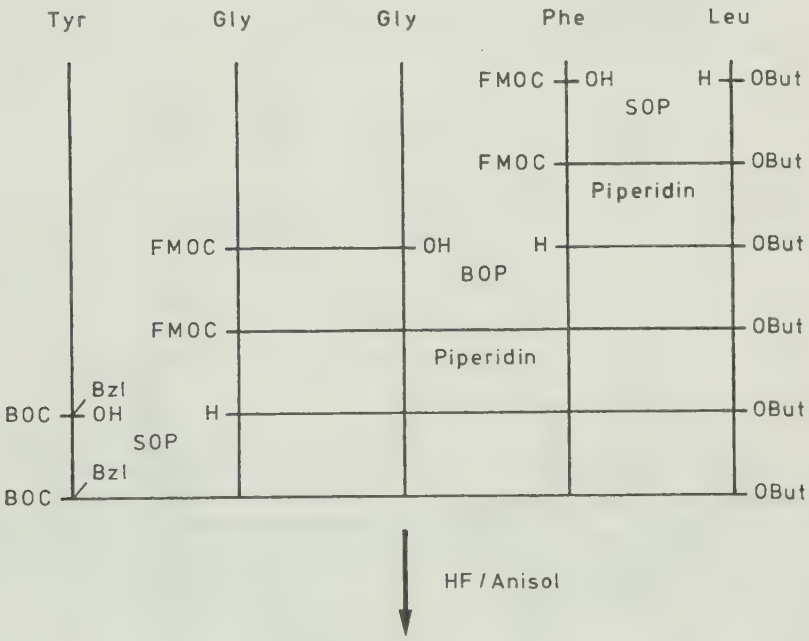


Abb. 53: ^{13}C-NMR-Spektrum von FMOC-Phe-OH, 300 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 2900 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

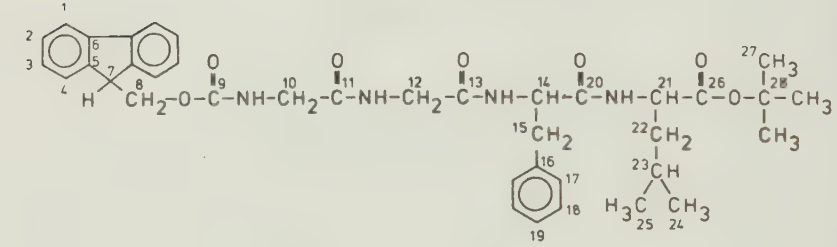
Die Kupplung zum Dipeptid wurde mit dem SOP-Reagenz durchgeführt. Nach Entfernen des FMOC-Restes mit Piperidin, läßt sich das so gewonnene Dipeptid H-Phe-Leu-OBut mit FMOC-Glycyl-glycin, das durch Umsatz von Glycyl-glycin mit Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid direkt synthetisiert werden kann, mit BOP-Reagenz zum FMOC-geschützten Tetrapeptid-tert.-butylester verlängern.



H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH

Syntheseschema 12: Synthese des Leucin-Enkephalins

Die Entacylierung von der Aminoschutzgruppe erfolgt wiederum mit Piperidin. Nach Kupplung des deblockierten Tetrapeptids mit BOC-Tyr(Bzl)-OH unter Zuhilfenahme von SOP-Reagenz, werden die Schutzgruppen durch Behandlung mit flüs-



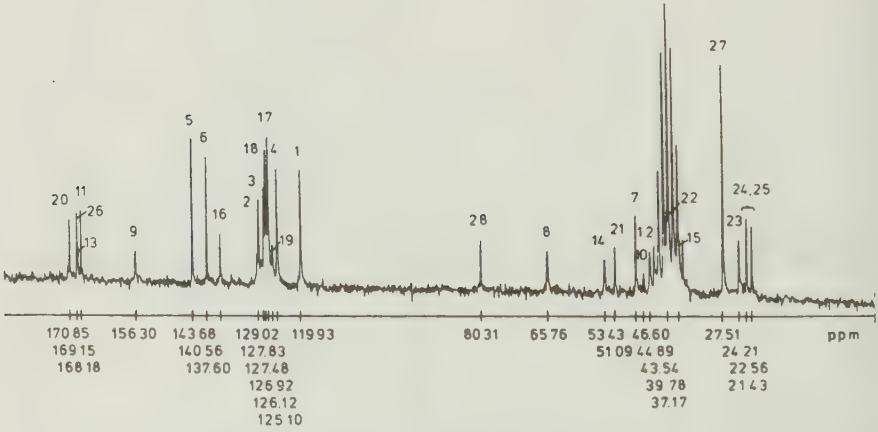


Abb. 55: ^{13}C-NMR-Spektrum von FMOC-Gly-Gly-Phe-Leu-OBut, 230 mg in DMSO-d_6, 23 000 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

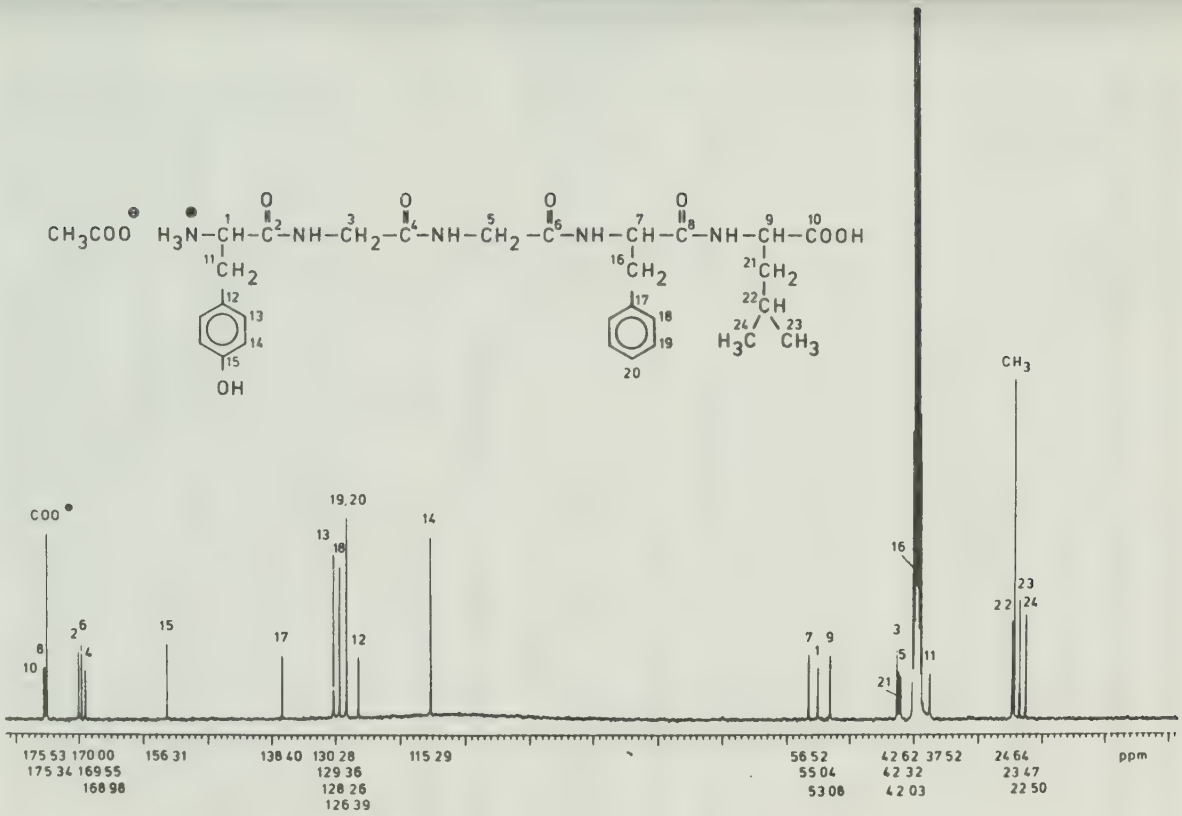


Abb. 54: ^{13}C-NMR-Spektrum des Leucin-Enkephalin-hydroacetats, 215 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 5000 Pulsinterferogramme, 100 MHz, Protonenbreitbandentkoppelt

sigem Fluorwasserstoff unter Zusatz von Anisol entfernt. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Sephadex G 15 (Elutionsmittel: 20 %ige Essigsäure) gereinigt und lyophilisiert. Das nach dieser Synthesestrategie gewonnene Pentapeptid stimmt in seinen Analysenwerten mit denen in der Literatur gemachten überein.

10.2 Synthese des Methionin-Enkephalins

Der für die Synthese des Leucin-Enkephalins eingeschlagene Weg mußte für das schwieriger zu synthetisierende Methioninanaloge, wegen des zu diesem Zeitpunkt noch nicht verfügbaren Methionin-tert.-butylesters, modifiziert werden. Von der Verwendung des Methylesters wird wegen der Bildung von Nebenprodukten[187] bei der alkalischen Verseifung als auch der langen, zu Racemisierung führenden Verseifungszeiten, abgesehen. Als optimal erwies sich in dieser Synthese die Verwendung des 4-Picolylesters, der durch die elegante Synthese von Mc Laren[188] in guten Ausbeuten zugänglich ist. Das Mc Laren-Verfahren bedient sich dabei einer Methode, die auf Dane[189] zurückgeht, und sich die Enaminbildung von Alkalisalzen der Aminosäuren mit 1.3-Dicarbonylverbindungen wie Acetessigester als interme - diäre Aminoschutzgruppe zunutze macht. Diese Produkte, die durch Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert sind, lassen sich mit Benzyl- bzw. Picolylhalogeniden in Dimethylformamid zu den N-geschützten Estern umsetzen. Die Entfernung

der Intermediärschutzgruppe durch sehr milde Acidolyse wird mit 1 N HCl in Methanol vorgenommen. Dieser so synthetisierte Methionin-4-picolylester wird mit BOC-Phe-OH

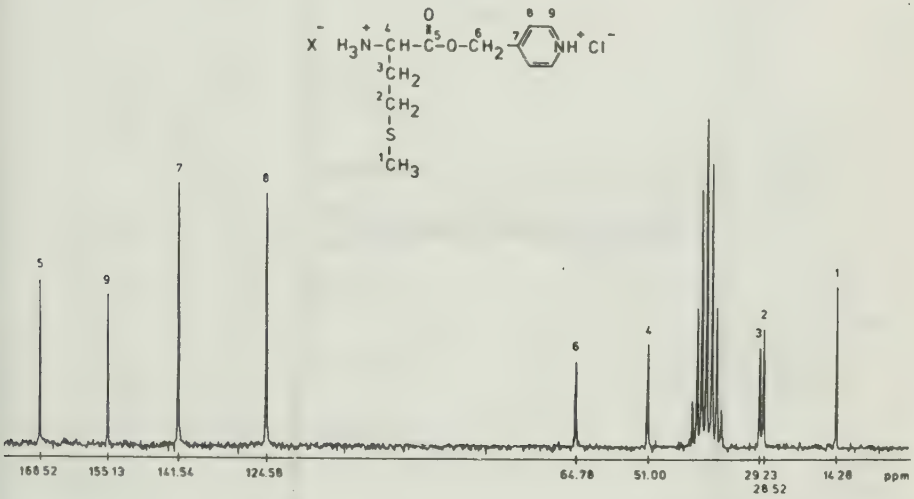


Abb. 57: ^{13}C-NMR-Spektrum von H-Met-OPic.2HCl; 200 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 13 200 Pulsinterferogramme protonenbreitbandentkoppelt

mit der DCCI/HOBt-Methode gekuppelt. Nach Deblockierung der BOC-Schutzgruppe durch Chlorwasserstoff/Essigsäure wird mit BOC-Glycin durch SOP-Reagenz zum Tripeptidester verlängert. Nach Deblockierung wird das Tripeptid H-Gly-Phe-Met-OPic mit BOC-Tyr(Bzl)-Gly-OH unter Zuhilfenahme des SOP-Reagenzes zum geschützten Enkephalin-picolylester gekuppelt. Die verbliebenen Schutzgruppen werden durch Be-

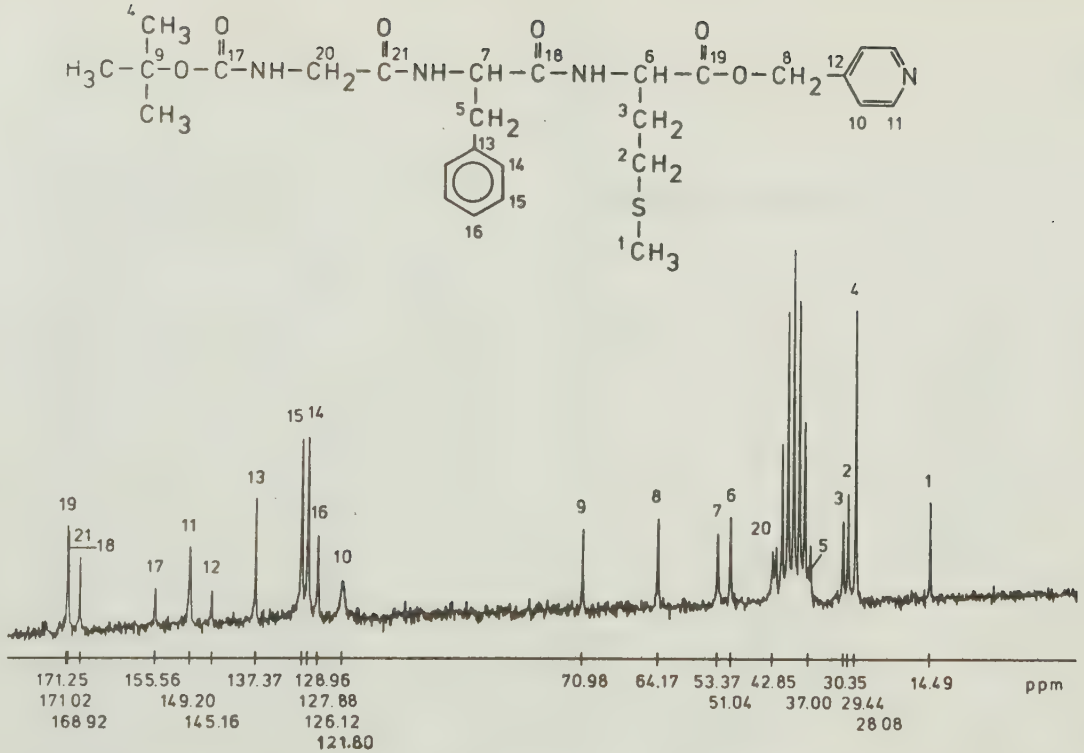


Abb. 58: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Gly-Phe-Met-OPic, 200 mg in 1 ml DMSO-d_6, 22.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 25 000 Pulsinterferogramme

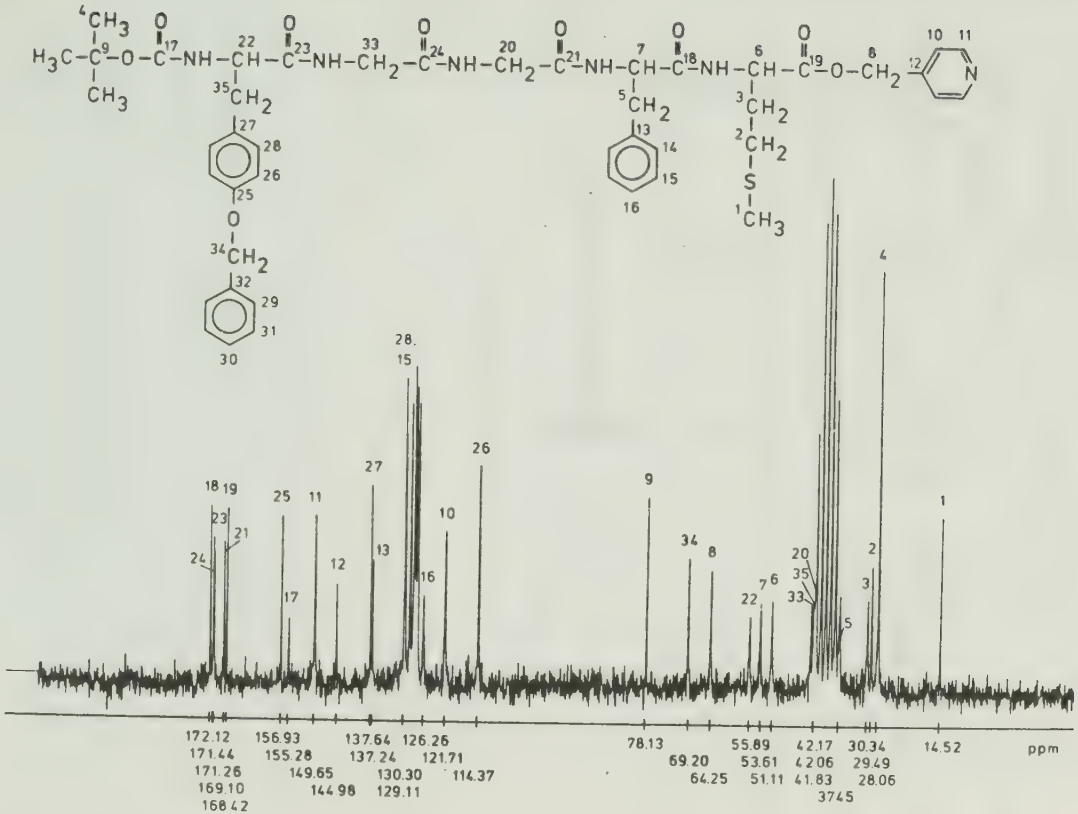
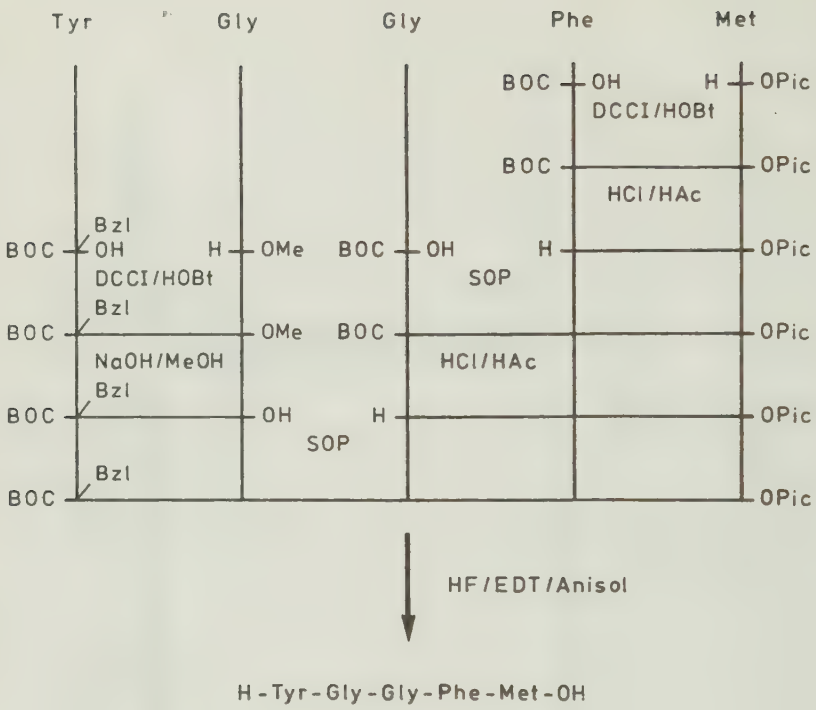


Abb. 56: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Met-OPic; 20.115 MHz, rotonenbreitbandentkoppelt, 150 mg in 1ml DMSO-d_6, 35 000 Pulsinterferrogramme



Syntheseschema 13: Synthese des Methionin-Enkephalins

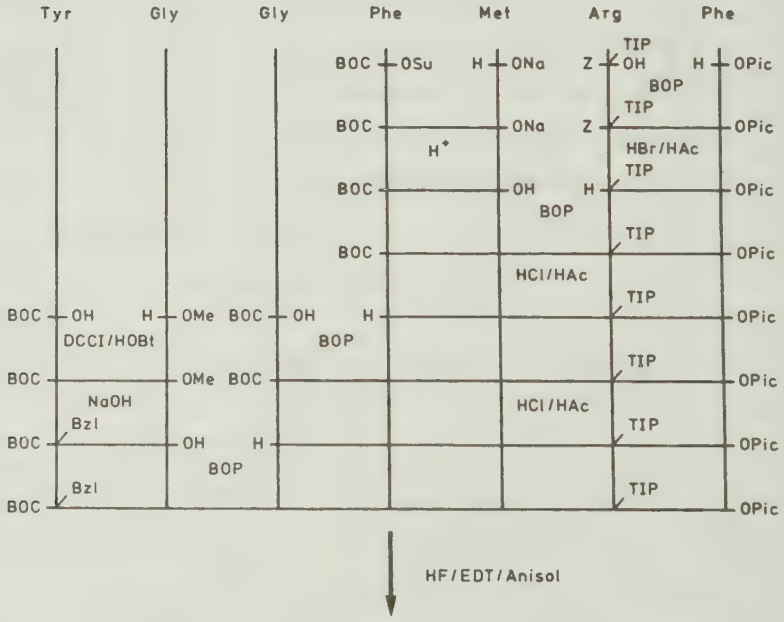
handlung mit flüssigem Fluorwasserstoff unter Zusatz von Ethandithiol/Anisol bei 0^{o} C innerhalb einer Stunde abgespalten. Das so erhaltene Peptid zeigt bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung, daß trotz Zugabe von Kationenfängern im Überschuß, einige Nebenprodukte gebildet werden, wie es bei der HF-Abspaltung von aromatische Aminosäuren enthaltenden Peptiden schon länger bekannt ist[190]. Das Rohpeptid kann durch zweifache Ionenaustauschchromato-

graphie, wobei bei der ersten Trennung an CM-Cellulose-Kationenaustauscher ein in der Ionenstärke und im pH-Wert steigender Gradient (0.01 - 0.3 M, pH 4.8 - 7.0) von Ammoniumacetat verwendet wird. Die zweite Reinigung wird an DEAE-Cellulose-Anionenaustauscher mit Pyridinacetatpuffer (1 % Pyridin, 0.04 % Essigsäure)[191] durchgeführt. Nach Gefriertrocknung erhält man ein Produkt, das sich nach ^{13}C-NMR-Untersuchung als H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OPic herausstellt; d.h. die Picolylestergruppierung wurde durch Fluorwasserstoff entgegen allen Erwartungen nicht abgespalten. Das native Methionin-Enkephalin wird schließlich durch kurze alkalische Hydrolyse aus dem Pentapeptidester erhalten. Nach Gefriertrocknung erhält man ein Produkt, das in den DC-Laufmittelsystemen n-Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1) sowie Methanol/Benzol/Chloroform/Wasser (40:40:40:5) einheitlich ist und die richtige Aminosäureanalyse ergibt.

10.3 Synthese von {Arg^6, Phe^7}-Methionin-Enkephalin

Das von der Gruppe von Udenfriend[192,193] aus boviner Medulla isolierte Heptapeptid H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe-OH zeigt im biologischen Test achtmal stärkere Wirkung als Methionin-Enkephalin, ist aber im Vergleich zu Morphin 63 mal weniger aktiv. Die hier vorgenommene klassische Synthese stellt eine Kombination der in den vorhergegangenen Kapiteln gemachten Neuentwicklungen und Ver-

fahren dar. Ausgangsderivat für das C-terminale Ende ist der Phenylalanin-4picolylester, der nach dem Mc Laren-Verfahren[188] dargestellt wird. Durch Kupplung desselben mit Z-Arg(TIP)-OH unter Verwendung von BOP-Reagenz erhält man den Dipeptidester Z-Arg(TIP)-Phe OPic, dessen Z-Schutzgruppe sich durch schonende Abspaltung mit 15 % Bromwasserstoff in Essigsäure unter Erhalt der Ester bzw. Sulfonamidschutzgruppe vornehmen läßt. Das so entacylierte Di-



Syntheseschema 14: Synthese des {Arg^6, Phe^7}-Methionin-Enkephalins

peptid wird mit BOC-Phe-Met-OH, das durch Aktivesterkupplung von BOC-Phe-OSu mit dem Natriumsalz des Methionins gewonnen wird, in einer HBTU-Kupplung zum geschützten Tetrapeptidester verlängert. Die BOC-Schutzgruppe wird wie üblich mit 1.2 N HCl/Essigsäure entfernt. Mit BOC-Glycin und BOP-Reagenz sowie entacyliertem Tetrapeptid als Aminokomponente erhält man BOC-Gly-Phe-Met-Arg(TIP)-Phe-OPic. Das deblockierte Pentapeptid wird schließlich ebenfalls mit BOP-Reagenz und dem Dipeptid BOC-Tyr(Bzl)-Gly-OH zum gewünschten Heptapeptid gekuppelt. Die Schutzgruppen entfernt man durch Behandlung mit flüssigem Fluorwasserstoff in Gegenwart von Ethandithiol. Die einstündige Prozedur reicht aber wie oben nicht zur Abspaltung der Picolylestergruppierung aus. Deshalb wird eine alkalische Verseifung nachträglich durchgeführt. Das Rohpeptid wird anschließend durch Säulenchromatographie an Sephadex G 25 (Elutionsmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5, Oberphase) sowie Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose mit einem Ionenstärkegradienten von 0.01 - 0.3 M sowie einem pH-Gradienten von 4.8 - 7.0 von Ammoniumacetatpuffer gereinigt.

10.4 Synthese des Methionin-Enkephalinamids

Durch Überführung der freien Carboxylgruppe des Methioninrestes im Methionin-Enkephalin in das Säureamid, sollte sich die Halbwertszeit verlängern sowie die Stabilität gegen Angriffe von Carboxypeptidasen erhöhen lassen. Dies

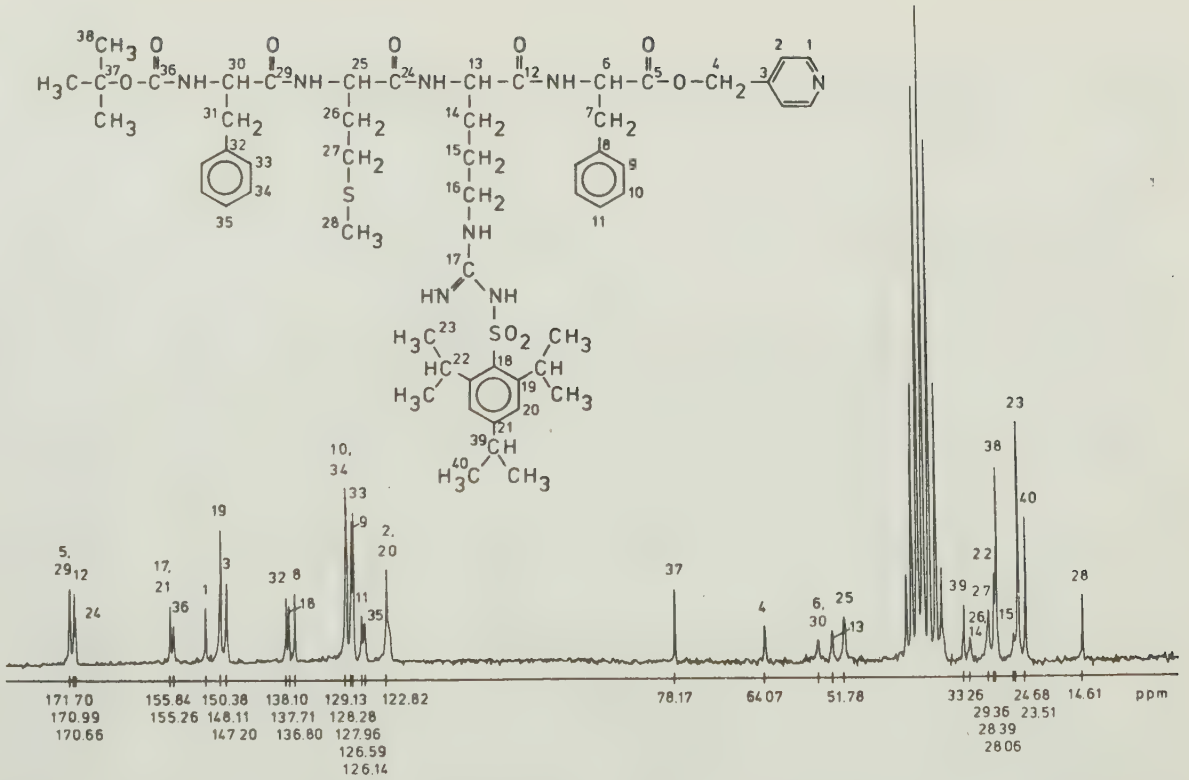


Abb. 59: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Phe-Met-Arg(TIP)-Phe-OPic, 140 mg in DMSO-d_6 (1 ml), 22.63 MHz, 85 000 Pulsinterferogramme, protonenbreitbandentkoppelt

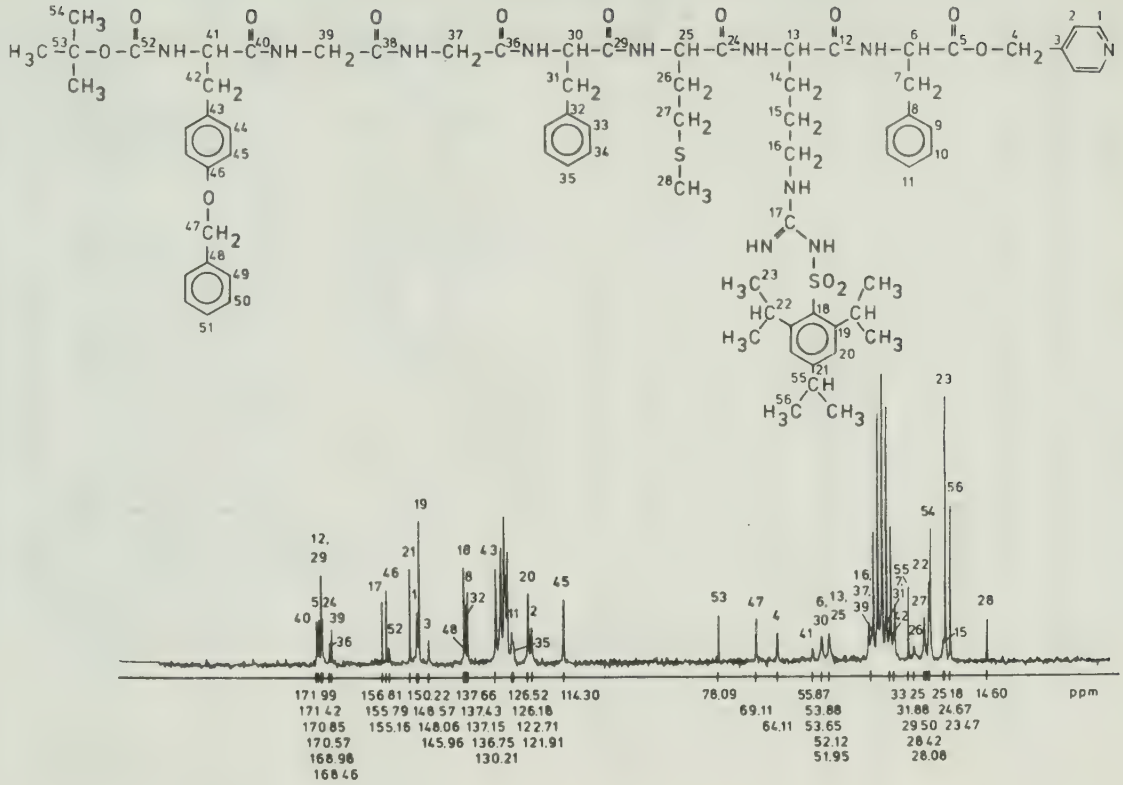


Abb. 60: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Met-Arg(TIP)-Phe-OPic, 230 mg in 1 ml DMSO-d_6, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 7 500 Pulsinter-

wird auch durch die biologischen Tests des durch Festphasensynthese dargestellten Peptids von Chang[194] bestätigt. Das Methionin-Enkephalinamid zeigt die zweifache biologische Aktivität gegenüber dem nativen Peptid mit freier Carboxylgruppe.

Die hier durchgeführte klassische Synthese wird nach folgender Strategie aufgebaut: Sukzessiver Aufbau vom C-terminalen Ende her, wobei alle Kupplungen nach der DCCI/N-Hydroxysuccinimid-Methode durchgeführt werden. Durch Verknüpfung von BOC-Phenylalanin mit Methioninmethylester erhält man das Dipeptid BOC-Phe-Met-OMe, das durch Behandlung mit Ammoniak in Methanol in das Amid überführt wird.

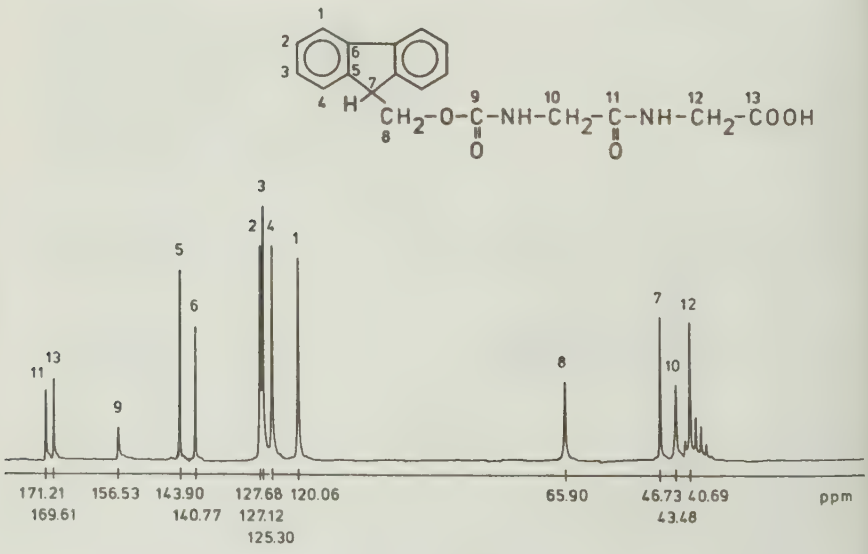


Abb. 61: ^{13}C-NMR-Spektrum von FMOC-Gly-Gly-OH, 22.63 MHz, 260 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 4488 Pulsinterferogramme, protonenbreitbandentkoppelt

Die Abspaltung der BOC-Schutzgruppe wird unter Zusatz von Anisol mit 1.2 N HCl/Essigsäure unter Schutzgasatmosphäre (N_2) vorgenommen. Die Verlängerung zum Tetrapeptid erfolgt

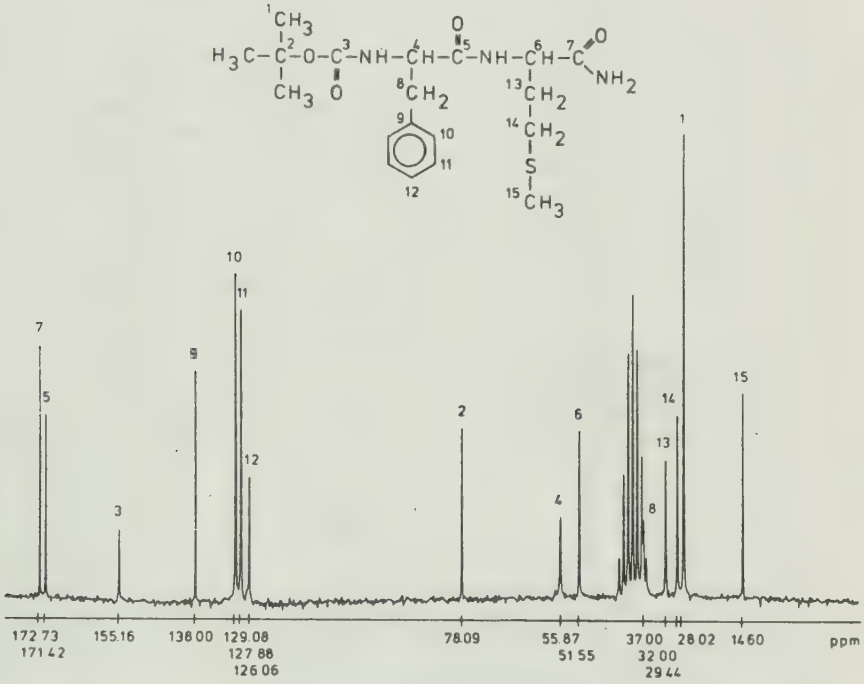
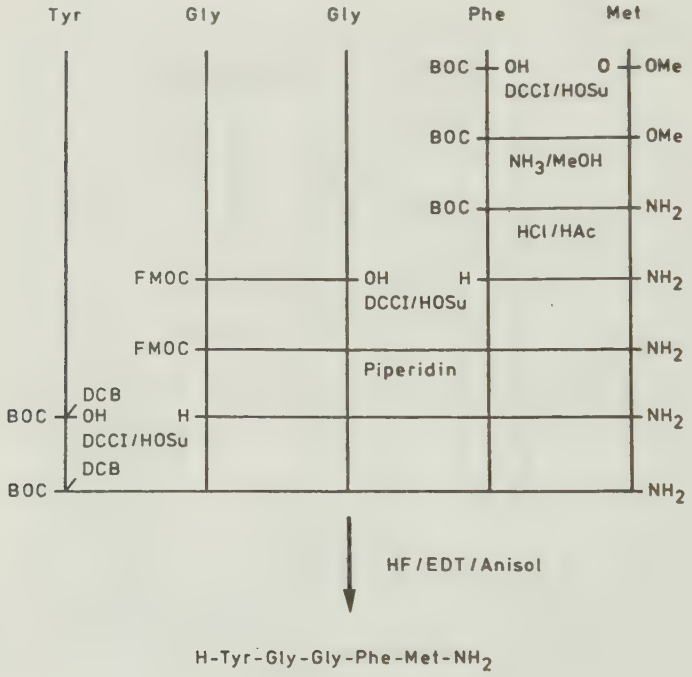


Abb. 62: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Phe-Met-NH_2, 180 mg in 1 ml DMSO-d_6, 20.115 MHz, 5 000 Pulsinterferogramme, protonenbreitbandentkoppelt

mit FMOC-Glycyl-glycin, das aus Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid und Glycyl-glycin unter Schotten-Baumann-Bedingungen in guten Ausbeuten direkt zugänglich ist. Der basisch durch β-Eliminierung nach dem ElcB-Typ entfernbare FMOC-Rest[186] wird hier einer acidolytisch abspaltbaren

Blockierung der Vorzug gegeben, da bei schwefelhaltigen Aminosäuren wie Methionin, Säurebehandlung immer zu Nebenprodukten wie S-Sulfoxid- bzw. S-Sulfonbildung führt.



Syntheseschema 15: Synthese des Methionin-Enkephalinamids

Ferner können die bei einer sauren Deblockierung gebildeten Kationen den Schwefel elektrophil angreifen und zu S-Alkylderivaten führen. Die Entfernung des FMOC-Restes durch Piperidin ergibt das entacylierte Tetrapeptidamid, das durch Extraktion mit Wasser von dem ebenfalls gebildeten Addukt aus Dibenzofulven und Piperidin befreit wird.

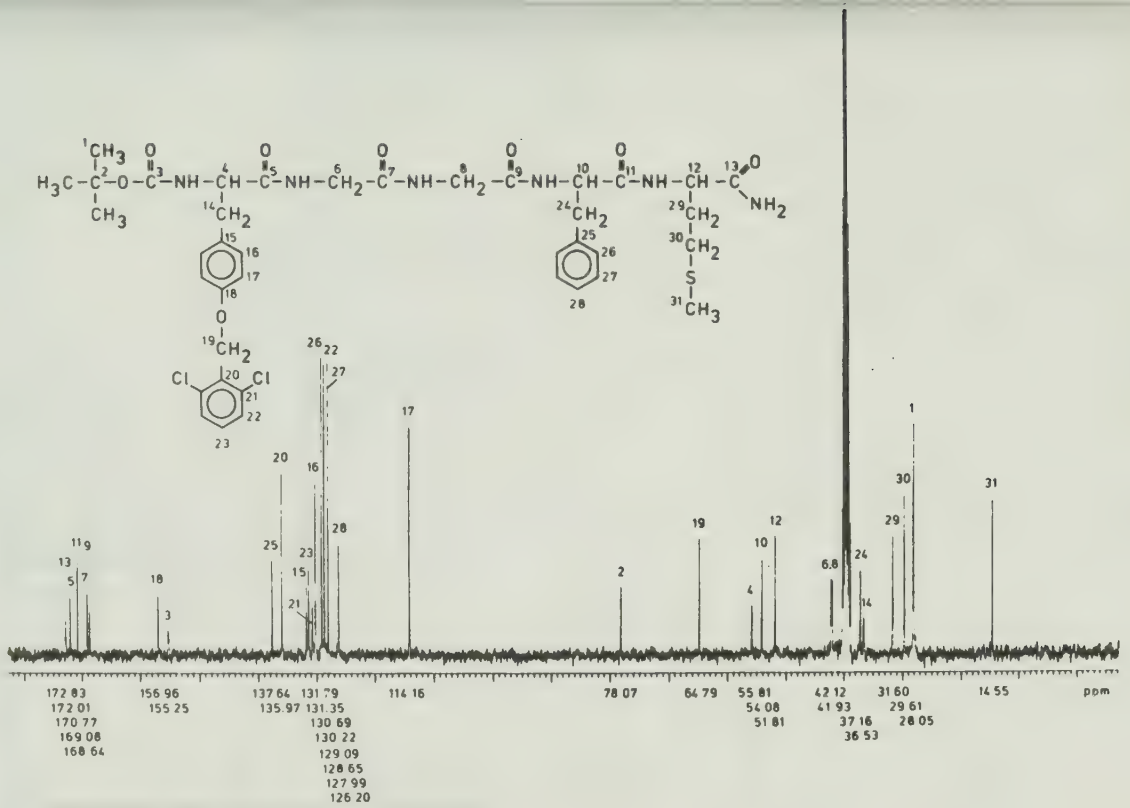


Abb. 63: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Tyr(DCB)-Gly-Gly-Phe-Met-NH_2, 100 MHz, 70 mg in DMSO-d_6, 4800 Pulsinterferogramme, protonenbreitbandentkoppelt

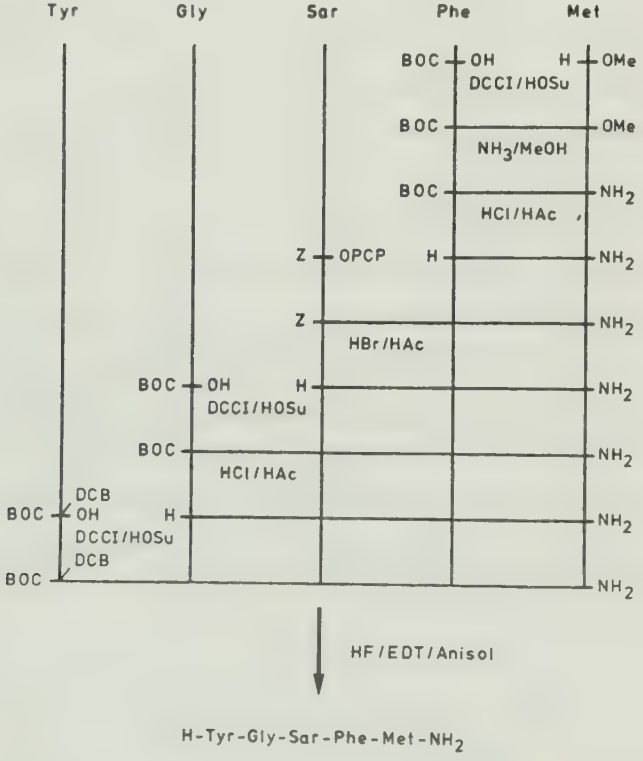
Durch Kupplung des Tetrapeptidamids mit BOC-O-(2.6-dichlorbenzyl)-tyrosin[195] erhält man das geschützte Methionin-Enkephalinamid. Die verbliebenen Schutzgruppen werden durch Fluorwasserstoffbehandlung bei 0° C unter Zusatz der Kationenfänger Anisol und Ethandithiol abgespalten. Um kleine Verunreinigungen zu entfernen, wird das Rohpeptid durch Säulenchromatographie an Kieselgel Si 60 (Merck) durch Verteilungschromatographie gereinigt. Als Elutionsmittelsystem dient das quaternäre Gemisch Toluol/Chloroform/Methanol/Wasser (40:40:40:5).

Methionin-Enkephalinamid

Abb. 64: HPLC-Chromatogramm vor (A) und nach säulenchromatographischer Reinigung (B). Bedingungen: RP 18 Lichrosorb, 10 µm, 25 x 0.4 cm, Mobile Phase: Acetonitril/Triethylammoniumphosphat (pH 3.2) 30:70 (v:v

10.5 Synthese des {Sar^3}-Methionin-Enkephalinamids

Syntheseschema 16 zeigt den Verlauf des neuen, back-bone-veränderten Enkephalinamids H-Tyr-Gly-Sar-Phe-Met-NH_2, bei dem der Glycinrest in Position 3 des Moleküls durch die Aminosäure Sarcosin substituiert ist.

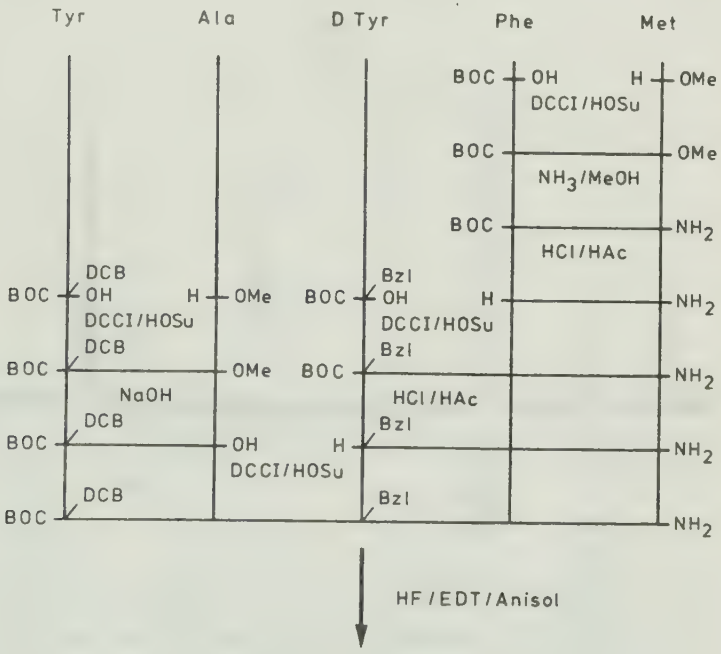


Syntheseschema 16: Synthese des {Sar^3}-Methionin-Enkephalinamids

Der Aufbau des Pentapeptidamids erfolgt hier stufenweise vom C-terminalen Ende her. Das Dipeptid H-Phe-Met-NH_2 wird in analogerweise wie in der vorhergegangenen Synthese aufgebaut. Durch Aktivesterkupplung mit Z-Sarcosin-pentachlorphenylester erhält man das geschützte Tripeptidamid Z-Sar-Phe-Met-NH_2, dessen Z-Schutzgruppe durch Behandlung mit Bromwasserstoff/Essigsäure unter Stickstoffatmosphäre zum entacylierten Produkt H-Sar-Phe-Met-NH_2 führt. Nach Kupplung mit BOC-Glycin nach der DCCI/N-Hydroxysuccinimid-Variante zum Tetrapeptid BOC-Gly-Sar-Phe-Met-NH_2 wird die BOC-Gruppe mit Chlorwasserstoff/Essigsäure entfernt und mit dem Tyrosinderivat BOC-Tyr(DCB)-OH mit DCCI/N-Hydroxysuccinimid in das geschützte Enkephalinderivat überführt. Die Schutzgruppenentfernung wird in analoger Weise wie zuvor beschrieben mit Fluorwasserstoff vorgenommen. Die Reinigung erfolgt durch Verteilungschromatographie an Kieselgel Si 60 mit dem Elutionsmittelsystem Toluol/Chloroform/Methanol/Wasser (40:40:40:5). Die so erhaltene Substanz zeigt die berechneten Werte für die Elementaranalyse und ist in zwei Fließmittelsystemen dünnschichtchromatographisch einheitlich. Die HPLC-Analyse zeigt ebenfalls Einheitlichkeit.

10.6 Synthese des {Ala^2, D-Tyr^3}-Methionin-Enkephalinamids

Das Pentapeptid H-Tyr-Ala-D-Tyr-Phe-Met-NH_2 ist ein dem Methionin-Enkephalin verwandtes Peptid, das auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit dem LH/FSH-Releasinghormon sowohl LH/FSH-Aktivität als auch die analgetische Wirkung des Enkephalins auf sich vereinigen soll[17,196]. Die Synthese lehnt sich an diejenigen der zuvor beschriebenen



Syntheseschema 17: Synthese des {Ala^2, D-Tyr^3}-Methionin-Enkephalinamids

Peptide an. Als Kupplungsmethode wird die DCCI/N-Hydroxy-succinimid-Methode verwendet. Als Aufbaustrategie wird hier die Fragmentkupplung nach dem Prinzip 2+3 bevorzugt. Das

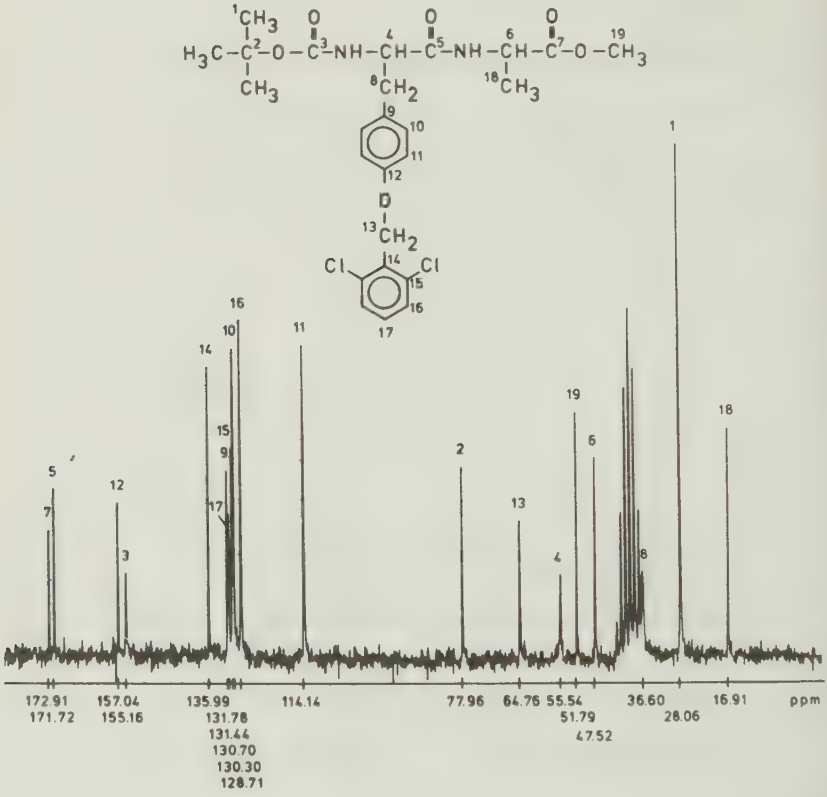


Abb. 65: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Tyr(DCB)-Ala-OMe, 250 mg in 1 ml DMSO-d_6, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 6 000 Pulsinterferogramme

C-terminale Tripeptid wird durch Kupplung von BOC-Tyr(Bzl)-OH mit dem in der vorstehenden Synthese dargestellten Dipeptidamid H-Phe-Met-NH_2 synthetisiert. Nach Entacylierung mit HCl/Essigsäure erhält man die Aminokomponente H-D-Tyr (Bzl)-Phe-Met-NH_2, das mit der Carboxylkomponente BOC-Tyr (DCB)-Ala-OH zum geschützten Pentapeptidamid verknüpft wird. Das N-terminale Dipeptid wird durch Kupplung von BOC-Tyr (DCB)-OH mit Alaninmethylester und anschließender Verseifung des Dipeptidesters mit 1N Natriumhydroxid in Metha-

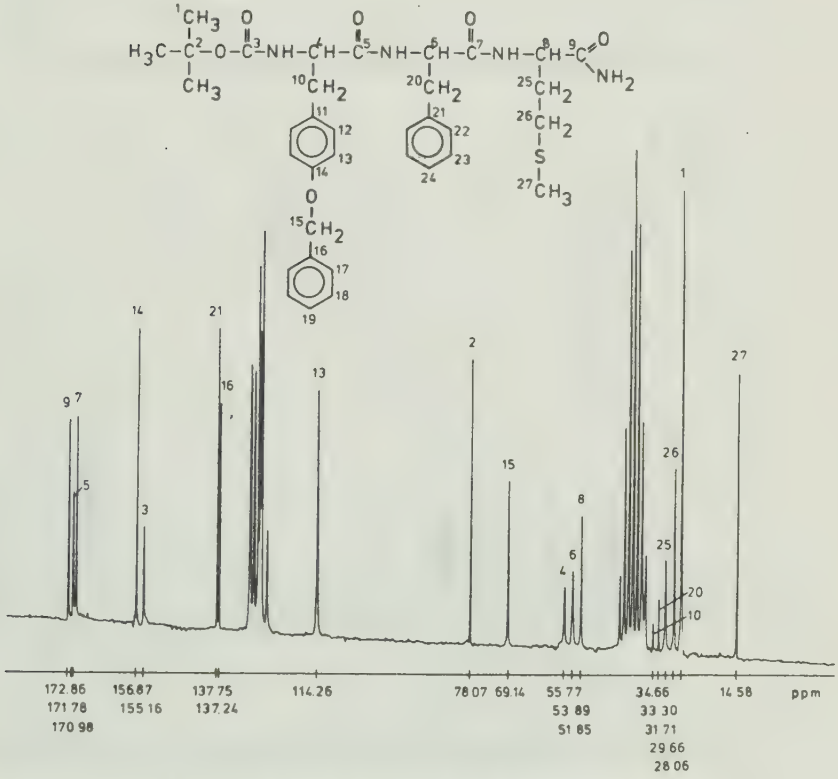


Abb. 66: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-D-Tyr-Phe-Met-NH_2

nol synthetisiert. Die Abspaltung der verbliebenen BOC-, 2.6-Dichlorbenzyl-und Benzylschutzgruppe wird mit der Sakakibara-Methode in flüssigem Fluorwasserstoff vorgenommen. Um die dabei auftretenden Nebenreaktionen weitgehend zurückzudrängen, wird sowohl Ethandithiol als auch Anisol hinzugegeben. Das von den Schutzgruppen befreite Peptid wird durch Verteilungschromatographie an Kieselgel Si 60 mit dem in der vorstehenden Synthese verwendeten Elutionsmittelsystem gereinigt. Die erhaltene Substanz zeigt sich sowohl dünnschichtchromatographisch als auch HPLC-analytisch einheitlich. Die durchgeführten Elementar- und Aminosäureanalysen ergeben die berechneten Werte.

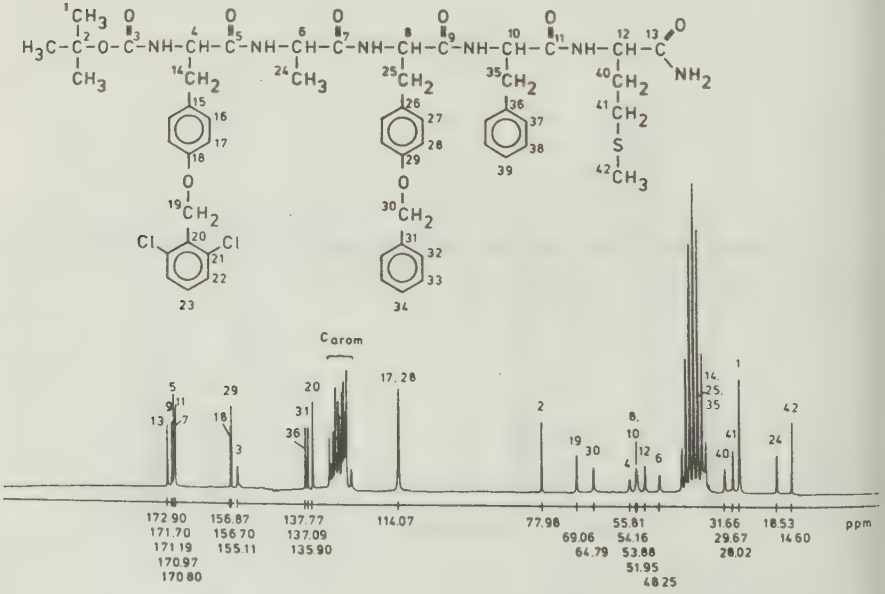


Abb. 67: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Tyr(DCB)-Ala-D-Tyr(Bzl)-Phe-Met-NH_2, 150 mg in 1 ml DMSO-d_6, 20.115 MHz, 241 000 Pulsinterferogramme

11. CD-Untersuchungen

11.1 Zirkulardichroismus von Peptiden

Durchstrahlt man eine optisch aktive Substanz mit linear-polarisiertem Licht, so wird die Schwingungsebene des austretenden Lichtes um einen bestimmten Betrag gegenüber dem des einfallenden Lichtes gedreht. Wenn die Substanz zusätzlich eine chromophore Gruppe besitzt, so tritt das einfallende linear-polarisierte Licht im Bereich der Absorbtionsbande elliptisch-polarisiert wieder aus. Der Theta-Wert ergibt sich aus dem Achsenverhältnis der Ellipse, er ist ein Maß für die Elliptizität. Die Änderung der Elliptizität mit der Wellenlänge wird als Zirkulardichroismus bezeichnet[251,252].

Der CD-Effekt von Peptiden im fernen Ultraviolett läßt sich auf die Elektronenanregung der Carbonylgruppe von Amid-, Ester- und Carboxylgruppen zurückführen. So wird die kürzerwellige Absorbtionsbande bei 190 nm durch den Elektronenübergang eines Elektrons der Peptidcarbonylgruppe vom bindenden π-Orbital in den antibindenden π^*-Zustand verursacht[253], während die etwas schwächere Absorbtionsbande bei etwa 220 nm durch Anregung von nichtbindenden Elektronen des Sauerstoffs in das antibindende π^*-Orbital der Peptidbindung zustande kommt[254].

Außerdem tragen sowohl die asymmetrischen Kohlenstoffatome der Aminosäuren als auch die räumliche Anordnung der Peptide zur chiroptischen Eigenschaft bei[255].

Die Messung des Zirkulardichroismus hat sich vor allem bei Konformationsuntersuchungen von Peptiden in Lösung als wertvolle Untersuchungsmethode bewährt[256,257]. Starke Änderungen dieses Effektes treten vor allem bei Peptiden ab fünf Aminosäureresten an auf[258], da ab dieser Größe für Peptide die Möglichkeit besteht, geordnete Strukturen anzunehmen.

Die Basisspektren für die drei Konformationstypen α-Helix, β-Struktur und "Random coil" wurden durch Messungen an synthetischen Polyaminosäuren gewonnen[259,260,261].

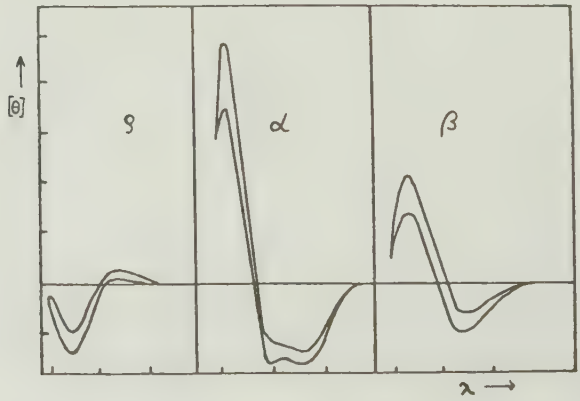


Abbildung 68: Basis-CD-Spektren von Homopolypeptiden.

Dabei ist für die sogenannte "Random coil"-Konformation eine stark negative Absorbtionsbande bei 198 nm charakteristisch, die dem π-π^*-Übergang zugeordnet wird[262]. Außerdem beobachtet man eine schwach positive Bande bei 223 nm. Die schwächste Bande bei 238 nm ist zusätzlich abhängig von der Ionenstärke.

Der π-π^*-Übergang der rechtsgängigen α-Helix macht sich normalerweise durch Aufspaltung der Absorbtionsbande in zwei Komponenten, einem sehr intensiven Cottoneffekt bei 192-194 nm und einer negativen Bande bei 206-208 nm bemerkbar. Diese von Moffit[263] als "exciton-splitting" bezeichnete Erscheinung, kommt durch Resonanzwechselwirkung des Peptidchromophors parallel bzw. senkrecht polarisiert zur Helixachse[264], zu stande. Der n-π^*-Übergang ist für das Elliptizitätsminimum bei 222-225 nm verantwortlich und ist sensitiv für Konformations-, pH-Wert-, Temperatur- und Lösungsmitteländerungen[265].

Die β-Struktur zeigt für den π-π^*-Übergang einen positiven Cottoneffekt, während der n-π^*-Übergang eine negative CD-Bande bei 215-220 nm [266] zur Folge hat.

11.2 CD-Messungen an Analogen des LH/FSH- "Releasing"-Hormons

Wie schon in Kapitel 3.2.3 ausgeführt, ist die hauptdichroitische Aktivität des nativen LH/FSH- "Releasing"-Hor-

mons in Wasser um 205 nm ($\Theta_{205} \simeq 18000$) zentriert. Dominiert wird das Spektrum aber im Bereich von 225-260 nm von den aromatischen Banden.

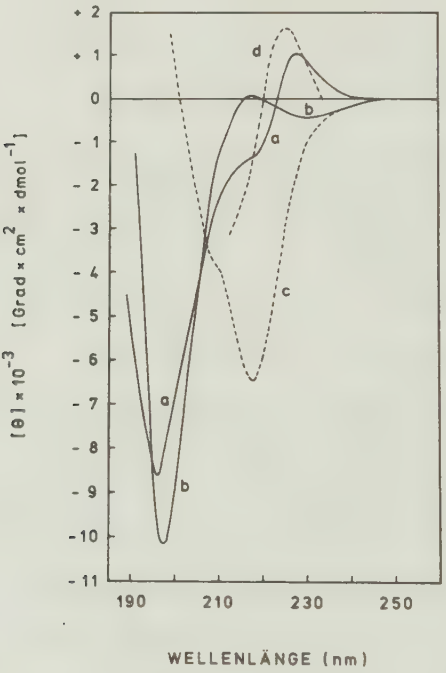


Abbildung 69: CD-Spektren des LH/FSH-"Releasing"-Hormons und seines C-terminalen Pentapeptids in verschiedenen Lösungsmitteln[40]: a) LH/FSH-RH in Wasser, b) C-terminales Pentapeptid in Wasser, c) LH/FSH-RH in Trifluorethanol, d) LH/FSH-RH in 20 % Trifluoressigs./80 % Trifluorethanol

Die einfachste Interpretation des Decapeptidamids würde die einer "Random coil"-Konformation des Peptides sein. Aber es ist zu beachten, daß die Interpretation von CD-Spektren von random coil-Peptiden noch nicht abgeschlossen ist; nach Woody[44], ist die exakte Zuordnung der Bande nicht klar.

Obwohl die positive Bande bei 218 nm entweder zum Teil oder als Ganzes einem $n-\pi^*$-Übergang zugeordnet werden muß. Auch die Bande bei 238 nm, die als Kriterium für eine geordnete Struktur gilt, ist umstritten, zumal hier das Vorhandensein von Tyrosin und Tryptophan, die Interpretation zusätzlich kompliziert, da die $n-\pi^*$- bzw. $\pi-\pi^*$-Übergänge der Peptidbindung bei der optischen Aktivität der Seitenkettenchromophore zu liegen kommen.

Die Wellenlängen der maximalen Elliptizitäten von Histidin, Tryptophan und Tyrosin fallen alle in die Region der CD-Bande einer α-Helix[267], aber auch eine β-Struktur hat beträchtliche negative Elliptizität in dieser Region[268].

Untersucht man das C-terminale Pentapeptid, so zeigt sich eine schwach negative Bande bei 231 nm sowie eine positive bei 218 nm . Das Erhöhen der Temperatur hat ein Abfall der Amplitude der positiven 218 nm Bande zur Folge, die Bande bei 231 nm wird davon nicht berührt. Beim Übergang von Wasser zu Trifluorethanol wird die Amplitude aber erhöht. Gleichzeitig erscheint eine

Schulter bei 217 nm, die dem Histidinrest zu zuordnen ist.

Während das CD-Spektrum des C-terminalen Pentapeptids in Einklang mit der Messung von Cann[40] steht und sich mit der Änderung des Lösungsmittels kaum ändert, ist bei dem hier vermessenen C-terminalen Heptapeptidamids beim Übergang von Wasser zu Trifluorethanol ein Verschwinden der positiven Bande bei 225 nm sowie der negativen Bande bei 205 nm zu beobachten, dafür erscheint eine positive bei 198-200 nm, ein cross-over-Punkt 1 bei 221 nm , sowie eine stark negative Bande bei 230 nm ($\Theta \approx -6875$). Dies spricht für eine β-Struktur.

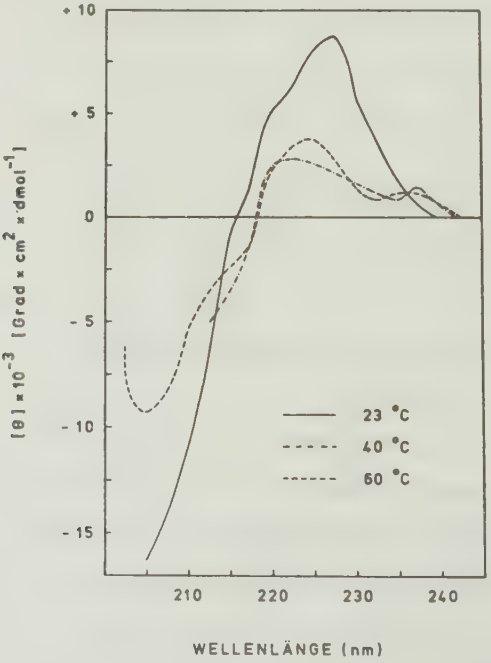


Abbildung 70: CD-Spektrum des C-terminalen Heptapeptids in Wasser

Die CD-Spektren der LH/FSH-Analogen sind ähnlich denen des nativen Hormons mit Maxima zwischen 220-230 nm , Minima nahe 240 nm und einem stark negativen Trend unter 215 nm . Die Messungen in Trifluorethanol sprechen auch hier für die Ausbildung von β-Strukturen.

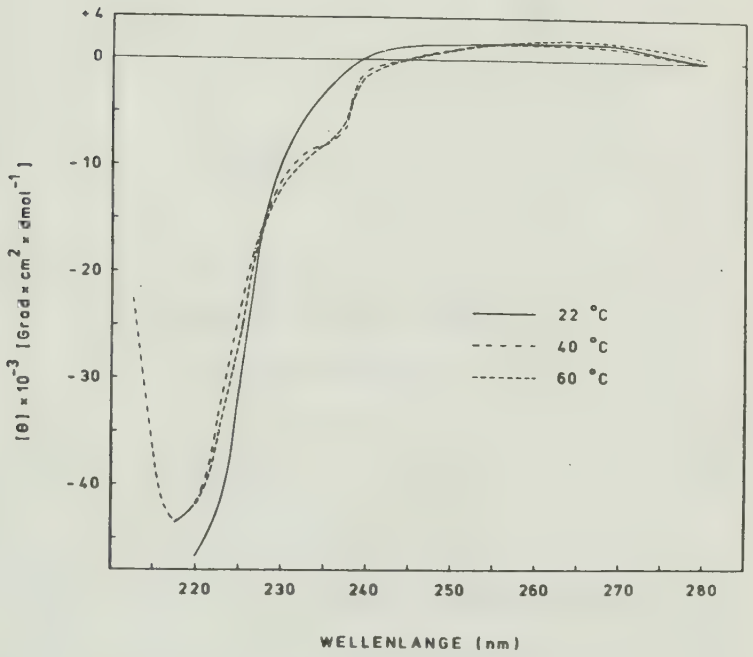


Abbildung 71: CD-Spektrum von {β-Ala^{6}, β-Ala-NH$_2$^{10}}-LH/FSH-"Releasing"-Hormon in Trifluorethanol

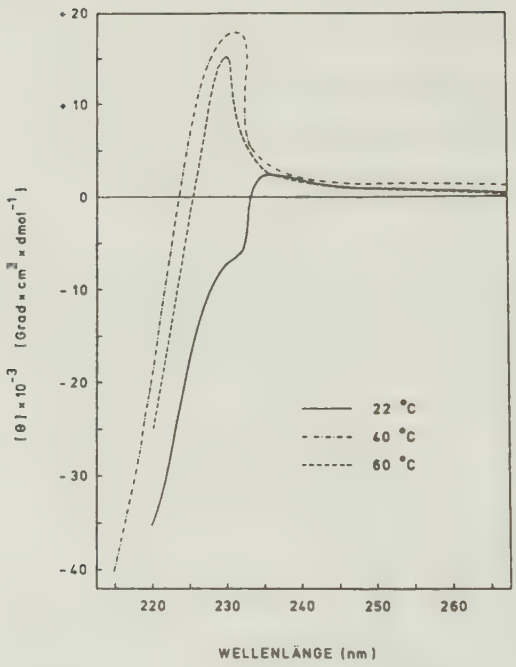


Abbildung 72: CD-Spektrum von {β-Ala^6, β-Ala-NH$_2$^{10}}-LH/FSH-"Releasing"-Hormon in Wasser

11.3 CD-Spektren der Enkephaline

Als Beispiel für die synthetisierten Enkephaline soll hier das {Sar^3}-Enkephalinamid Erwähnung finden.

Vergleicht man das in Wasser aufgenommene Spektrum mit jenem von Spirtes[269] für das Methionin-Enkephalin ver-

messene, so stellt man eine gute Übereinstimmung fest.

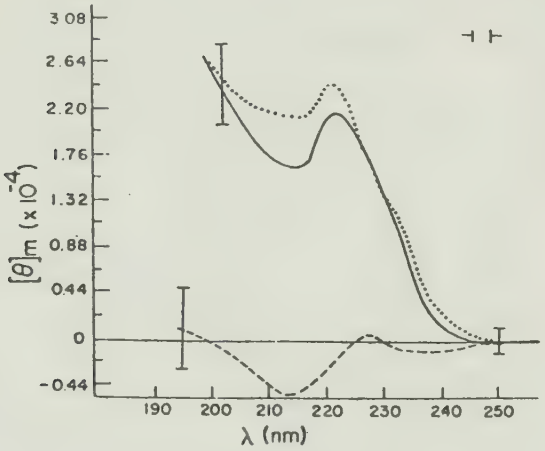


Abbildung 73: CD-Spektrum des Methionin-Enkephalins in Wasser nach Spirtes[269]; sowie der äquimolaren Lösung von Tyrosin und Phenylalanin (gestrichelt) und ihrer Differenz (gepunktet)

Dominiert wird das Spektrum von dem positiven Cotton-Effekt bei 225 nm , der von den aromatischen Seitenketten des Tyrosins bzw. Phenylalanins herrührt. Bei Erhöhung der Temperatur auf 60° C tritt eine Schulter bei ~230 nm auf, die dem Tyrosin zugeordnet werden muß, während die Absorbtion bei 220 nm für Phenylalanin charakteristisch ist.

Daß bei Erhöhung der Temperatur Feinstrukturen sichtbar werden, ist ein Indiz dafür, daß eine der beiden aromatischen Aminosäuren in eine Wasserstoffbrücke innerhalb des Moleküls integriert ist.

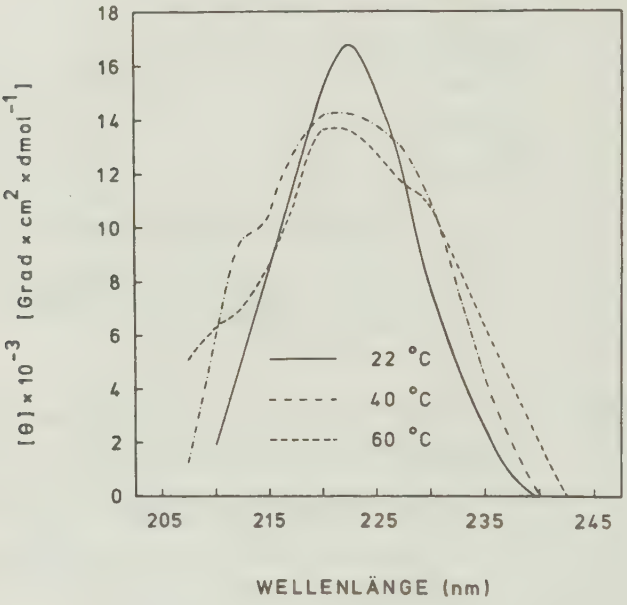


Abbildung 74: CD-Spektrum des {Sar^3}-Methionin-Enkephalinamids in Wasser

Beim Übergang von Wasser zu Trifluorethanol ist neben einem drastischen Abfall der aromatischen Amplitude, eine negative Absorbtion im Bereich um 210 nm zu beobachten. Dies spricht für die Ausbildung von geordneten Strukturen.

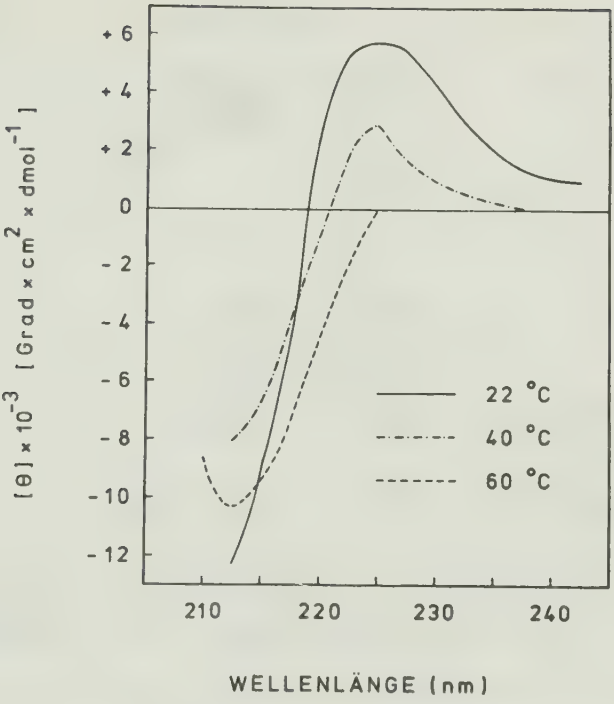


Abbildung 75: CD-Spektrum von {Sar^3}-Methionin-Enkephalinamid in Trifluorethanol

12. Biologische Tests

Die biologische Aktivität der dargestellten Enkephaline wird mit einer Apparatur, die in der folgenden Abbildung schematisch wiedergegeben ist, gemessen:

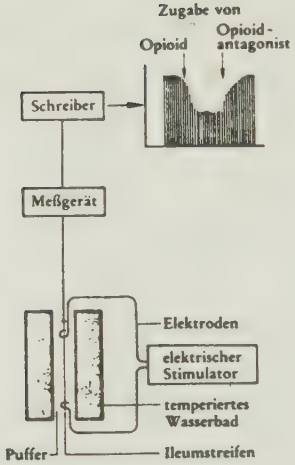


Abbildung 76:

Dabei wird ein Stück eines Meerschweinchen-Ileums, das reich an sogenannten μ-Rezeptoren ist, in einer temperierten und gepufferten Nährstofflösung aufgespannt. Mit Hilfe zweier Elektroden wird dieses dann elektrisch gereizt. Die dabei auftretenden Kontraktionen des Ileumstreifens werden gemessen und aufgezeichnet. Die Zugabe von Opioiden zur Nährlösung ereugt eine Hemmung der Kontraktion, die durch Zugabe von Antagonisten wie Naloxon, die eine Verdrängung des Opioids vom Rezeptor bewirken, wieder aufgehoben werden kann.

Die hier durchgeführten Messungen wurden gegen Morphin als Standard vorgenommen. Die Ergebnisse sind aus Tabelle Nr. 16 bzw. Abbildung Nr. 77 ersichtlich.

relative Wirksamk.	Substanz	IC_{50}(errechn.)	IC_{50} (graph.)
1	Morphinhydrochlorid	1.08×10^{-8}	2.26×10^{-8} $S = 1.18 \times 10^{-8}$
2	Met^5-Enkephalinamid	3.52×10^{-8}	7.3×10^{-8} $S = 2.4 \times 10^{-8}$
3	Leu^5-Enkephalin	8.2×10^{-8}	5.99×10^{-7} $S = 2.55 \times 10^{-7}$
4	Met^5-Enkephalin	0.46×10^{-8}	-
5	$\{Ala^2, D\text{-}Tyr^3\}$-Enkeph.-amid	0.2×10^{-6}	3.8×10^{-6} $S = 4.38 \times 10^{-6}$
6	$\{Sar^3\}$-Enkephalinamid	7.29×10^{-6}	3.73×10^{-6} $S = 1.76 \times 10^{-6}$

Tabelle 16: Biologische Aktivitäten der Enkephaline
S = Standardabweichung

Die gemessenen opioiden Aktivitäten von Leucin-, Methionin- und Methioninamid-Enkephalin stehen in Einklang mit den in der Literatur publizierten Werten. Führt man jedoch eine Substitution in Position drei des Enkephalinmoleküls durch, so ist wie aus den Beispielen 5 und 6 in Tabelle 16 ersichtlich, ein starker Abfall der biologischen Aktivität zu verzeichnen. Dies ist daraufzurückzuführen, daß mit der Substitution eine Änderung der Sekundärstruktur einhergeht, wie es auch im Abschnitt über die CD-Spektren schon erwähnt wurde. Die Änderung der Sekundärstruktur führt zu energetisch ungünstigen Populationen von Konformeren und damit zu einem Abfall der biologischen Aktivität.

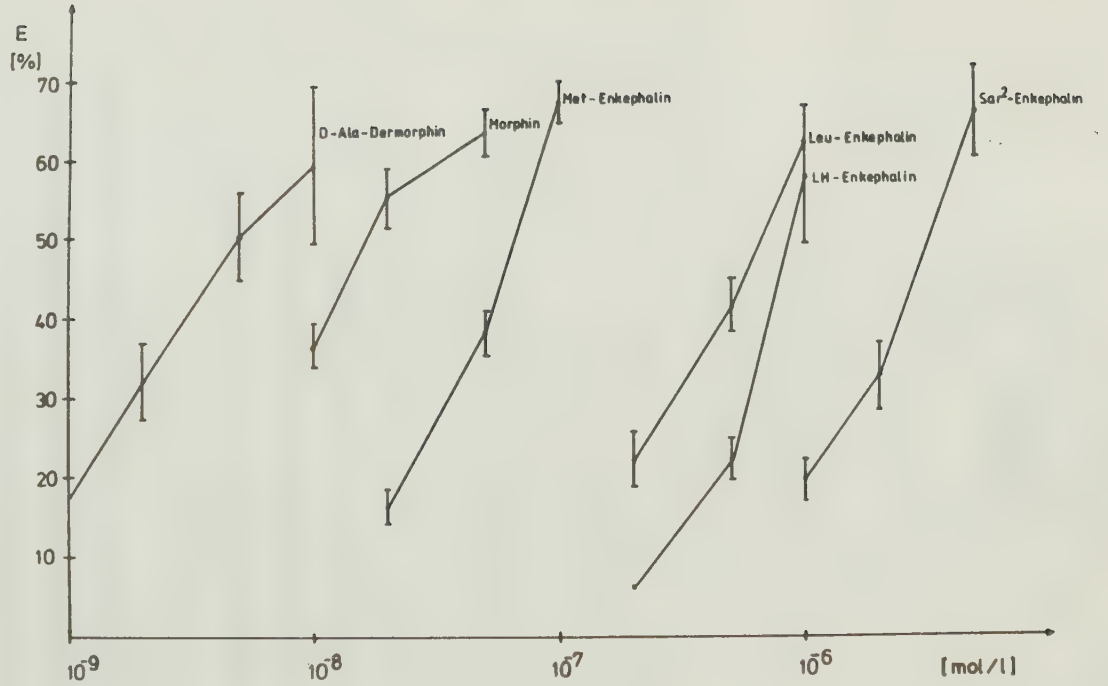


Abbildung 77: Hemmwirkung verschiedener opioider Peptide am elektrisch stimulierten Meerschweinchen-Ileum, N = 9 Ileumpräperationen, Werte: $\bar{x} \pm$ Standardabweichung

Die LH-ausschüttende Wirkung der LH/FSH-"Releasing"-Hormon-Analoga ergaben in Relation zum nativen "Releasing"-Hormon folgende Werte:

{β-Ala^6}-LH/FSH-RH	12:1
{γ-Abu^6}-LH/FSH-RH	> 3000:1
{h-Pyr^1}-LH/FSH-RH	∿ 10000:1
{Ekg^1}-LH/FSH-RH	> 10000:1

D.h. die getesteten Verbindungen sind deutlich weniger aktiv als das native Hormon; z.B. das β-Ala^6-Analoge zwölfmal weniger, das γ-Abu^6-Analoge dreitausendmal weniger usw.

Tabelle 17:
Meßwerte für {β-Ala^6}-LH/FSH-"Releasing"-Hormon:

Gelatine	LH/FSH-RH (nM)	{β-Ala^6}-LH-RH(nM)	LH (ng/ml)	±Standartabweichung	p-Wert
0.1 %	-	-	540	± 13	-
	3	-	4072	± 102	0.001
		0.01	845	± 24	0.001
		0.03	1066	± 27	0.001
		0.10	1088	± 37	0.001
		0.30	1249	± 52	0.001
		1.00	1706	± 157	0.001
		3.00	3069	± 77	0.001
		10.00	3342	± 267	0.001

Die Messungen wurden mit dispergierten Primärzellen der Hypophyse durchgeführt. Die LH-Aktivität wurde durch Doppel-Antikörper-"Radioimmunoassay" gemessen.

Die Ergebnisse zeigen, daß Substitution der Schlüsselposition 6 im LH/FSH-"Releasing"-Hormon durch β-Alanin zu einem Abfall der biologischen Aktivität führt, der darin begründet liegt, daß der "Backbone" des Moleküls offensichtlich dem des nativen Hormons noch sehr ähnlich ist, aber durch den zusätzlichen Einschub einer Methylengruppe kommt es zur freien Drehbarkeit um die CH_2-Bindungen und somit zu einer erhöhten Population von ungünstigen Konformeren. Dies erklärt auch den drastischen Abfall der Gonadoliberin-Ausschüttung des {γ-Abu^6}-Analogen. Hier muß, bedingt durch den Einschub von zwei weiteren Methylengruppierungen im Vergleich zu Glycin eine gänzlich andere Sekundärstruktur des Moleküls angenommen werden.

Die niedrige Aktivität der in Position 1 veränderten Analoga steht in Einklang mit den niedrigen Aktivitäten, die andere Arbeitsgruppen[87,88] beim Austausch der Pyroglutaminsäure gegen andere cyclische Aminosäuren gefunden haben. Durch den Einbau der β-Aminosäuren homo-Pyroglutaminsäure bzw. Ekconinsäure wird der Pyrrolidon- bzw. N-Methylpyrrolidonring um die CH_2-Gruppe frei drehbar und ist daher nicht mehr fixiert wie im Konformeren CC des nativen LH/FSH-"Releasing"-Hormons im Momany-Modell.

Von diesen Ergebnissen aus betrachtet, scheint es so, daß die γ-Carbonylgruppe der Pyroglutaminsäure für eine hohe biologische Aktivität notwendig ist, indem sie Wasserstoff-

brücken mit einem komplementären Teil des Rezeptors oder mit einem anderen Teil des Peptids ausbildet.

Über die beiden Analoga {D-Phe^2,β-Ala^6}-LH/FSH-RH und {D-Phe^2,β-Ala^{10}}-LH/FSH-RH, die antagonistische Eigenschaften haben sollten, knn nur etwas über den ID_{50}-Wert von {D-Phe^2, β-Ala^{10}}-LH/FSH-RH ausgesagt werden, er liegt bei > 33:1. Außerdem sei angemerkt, daß bei den vorgenommenen Messungen ein LH-ausschüttender Effekt auftritt, der durch den Tester nicht erklärt werden kann, zusätzlich wurden die Messungen nicht bis zu den für die antagonistische Wirkung relevanten Bereiche ähnlicher Verbindungen durchgeführt, so daß nur wenig über die antagonistische Wirkung dieser Analoga ausgesagt werden kann.

Gelatine	LH/FSH-RH(nM)	{D-Phe^2,β-Ala^{10}}(nM)	LH(ng/ml)	±Standartabweichung	p-Wert
0.1 %	-	-	540	± 73	-
	3.0	-	3564	±340	0.01
		0.1	426	± 29	n.s.
		0.3	433	± 39	n.s.
		1.0	563	± 38	n.s.
		3.0	505	± 67	n.s.
		10.0	538	± 61	n.s.
		30.0	437	± 30	n.s.
	3.0	0.1	3151	±126	0.001
	3.0	0.3	3113	±228	0.001
	3.0	1.0	3353	±150	0.001
	3.0	10.0	3702	±209	0.001
	3.0	100.0	3392	±341	0.001

Tabelle 18: Meßwerte für {D-Phe^2,β-Ala^{10}}-LH/FSH-RH

Im oberen Teil der vorstehenden Tabelle ist die agonistische Wirksamkeit der Verbindung angegeben; sie ist etwa dreitausendmal weniger aktiv als das native Hormon. Im unteren Teil der Tabelle sind die Meßwerte für die antagonistische Wirksamkeit der Verbindung aufgeführt.

Daß die Enkephaline und ihre Analoga direkt auf die Hypophyse einwirken können und damit die hormonelle Sekretion von LH und FSH bewirken, wird aus den Meßwerten der Tabellen 19 und 20 ersichtlich. Die Enkephaline können entweder agonistische oder antagonistische Wirkung besitzen.

	Δ LH		Δ FSH	
	10 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
Met-Enkephalin	12 ng/ml Med.	n. s.	80 ng/ml Med.	50 ng/ml Med.
Met-Enkeph.-amid	120 ng/ml Med.	140 ng/ml Med.	730 ng/ml Med.	860 ng/ml Med.

Tabelle 19: Agonistische Wirkung der Enkephaline

	Δ LH	
	10 µg/ml	100 µg/ml
Leerwert	-	130 ng/ml
Leu-Enkephalin	50 ng/ml	-
Met-Enkephalin	120 ng/ml	40 ng/ml
LH-RH	0.6 ng/ml	0.6 ng/ml

Tabelle 20: Antagonistische Wirkung der Enkephaline

Tabelle 19 zeigt, daß nur das Methionin-Enkephalinamid, nicht aber das Methionin-Enkephalin agonistische Eigenschaften hat. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Leucin-Enkephalinamid/Leucin-Enkephalin erhalten.

Aus Tabelle 20 ist zu entnehmen, daß sowohl Leucin- als auch Methionin-Enkephalin antagonistische Eigenschaften besitzen. Während Leucin-Enkephalin schon bei einer Dosis von 10 µg/ml Medium die LH-"Response" des LH/FSH-"Releasing-Hormons" partiell inhibiert, wird dies für Methionin-Enkephalin erst bei 100 µg/ml Medium erreicht.

Damit wäre bewiesen, daß die Modelle, die Momany auf grund seiner Berechnungen aufgestellt hat, ihre Richtigkeit haben und so zum besseren Verständnis der Struktur-Aktivitätsbeziehungen der hypothalamischen "Releasing"- und "Inhibiting"-Hormone beitragen können.

Über die anderen in dieser Arbeit synthetisierten LH/FSH-Analoga sowie über die LH-ausschüttende Wirkung der restlichen Enkephalinderivate kann hier noch nicht berichtet werden, da sich zum Zeitpunkt der Erstellung des Manuskripts die Prioritäten des Testers Prof. C. Bowers von der Tulane University von New Orleans geändert haben.

Für die Aktivitätstests der Enkephaline danke ich Herrn Prof. Dr. Ruoff vom Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen.

13.
Experimenteller Teil

A. Spektroskopische Methoden

α) NMR-Spektroskopie

Die Aufnahmen der PFT-$^{13}C\{^{1}H\}$-NMR-Spektren erfolgt mit folgenden Geräten: Bruker HFX-90-Multikern (22.628 MHz), WP-80-NMR-Spektrometer (20.115 MHz) oder mit dem 400 MHz-Spektrometer von Bruker. Die Spektren werden durch Akkumulation von ^{13}C-Impulsferrogrammen (2.5-3.5 µsec, o.4 sec/scan) und anschließender Fouriertransformation (BNC-28-Rechner) des akkumulierten Interferrogramms erhalten. Für die Aufnahmen am HFX-90 bzw. WP-80-Gerät wird jeweils zwischen 200-350 mg Substanz pro 1.5 ml Lösungsmittel verwendet.

β) Massenspektroskopie

Die Elektronenstoß- und FD-Massenspektren werden mit dem VARIAN-MAT 711-Gerät (Direkteinlaß, 70 eV Elektronenenergie, bis 250° C Ionenquelletemperatur) aufgenommen.

γ) Drehwerte

Die Drehwerte werden entweder auf einem OLD 5-Polarimeter der Fa. Zeiss, Oberkochen oder auf einem Perkin-Elmer 141-Polarimeter gemessen.

δ) CD-Spektren

Die Aufnahmen der CD-Spektren erfolgt auf dem Dichrograph II der Fa. Roussel-Jouan, Frankreich

ε) IR-Spektren

Vermessung als KBr-Pressling mit dem Gerät N$^{o}_{=}$ 2021 der Fa. Perkin-Elmer; Einwaage 1.5 mg Substanz pro 300 mg KBr.

B. Chromatographische Methoden

α) Dünnschichtchromatographie

Verwendung finden DC-Fertigplatten 60 F_{254} der Fa. Merck

Fließmittelsysteme:

A: n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1)

B: n-Butanol/Essigester/Essigsäure/Wasser (1:1:1:1)

C: Chloroform/Toluol/Methanol (1:1:1)

D: Chloroform/Methanol/Benzol/Wasser (40:40:40:5)

Entwicklung der Chromatogramme erfolgt mit:

Ninhydrin[197]

Chlor/o-Tolidin[129]

Ehrlichs-Reagenz[130,198]

Pauly's-Reagenz[200]

Sakaguchi-Reaktion[201]

β) Gelchromatographie[197]:

Verwendung finden Säulen (1.6 X 100 bzw. 2.6 X 100 cm) der Fa. Pharmacia, Freiburg. Trennmedien: Sephadex-Gele LH 20, G 15, G 25 (Pharmacia). Elutionsmittel: Wasser, 15 % Essigsäure und n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5; Oberphase).

γ) Ionenaustauschchromatographie:

Säulen: 1.6 X 40 bzw. 1.6 X 70 cm
Trennmedien: CM-Cellulose bzw. DEAE-Cellulose (Serva)
Elutionsmittel: 0.01 - 0.4 M Gradient von Ammoniumacetat (pH 4.8 - 7.0) bzw. 1 % Pyridinacetat-Lsg.

Detektion: ISCO UA 5-Monitor, optische Einheit Typ 6 (280 nm) in Verbindung mit dem ISCO-Fraktionssammler bzw.
LKB-System mit UVICORD 4701 A-Einheit (254 nm) mit ULTRORAC 7000-Fraktionssammler und Einkanalschreiber 2210.

δ) HPLC-Chromatographie

JASCO-Einheit mit TWINCLE-Pumpe und UVIDEC 100 III-UV-Spektrometer sowie KNAUER-Schreiber.
Säulenmaterial:LICHROSORB RP 18 (Merck), 10 bzw. 5 µm sowie Aminophase 10 µm

Die Packung der Säulen wird nach der modifizierten Viskositätsmethode durchgeführt:
3 g LICHROSORB RP 18 (5 µm) werden in 15 ml Toluol suspendiert und 3 min mit Ultraschall behandelt. Nach Zugabe von 20 ml Cyclohexanol wird nochmals 5 min mit Ultraschall behandelt. Die so erhaltene Suspension wird sofort in das Füllrohr gegossen und durch Pumpen von n-Hexan unter maximal erreichbarem Druck in die Säule gepreßt. Die nach dieser Methode erhaltenen Säulen haben theoretische Bodenzahlen von ≃ 10 000 für Benzol (isokratische Elution: Methanol/Wasser 95:5 (1.1 ml/min) nach der Formel:
$n = 5.54(t_R/W_{0.5})^2$.

C. Sonstiges

Schmelzpunkte werden auf der Schmelzpunktsapparatur nach Dr. Tottoli der Fa. Büchi, Schweiz, bestimmt. Die angegebenen Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.
Titriert wird mit einem pH-Stat E 512/Impulsomat E 473 der Fa. Metrohm
Die Aminosäureanalysen werden auf dem automatischen Biotronik-Chromatographiesystem LC-6000 E durchgeführt.

D. Chemikalien

Lösungsmittel werden nach den üblichen Vorschriften[202] getrocknet und anschließend über eine 140 cm Vigreux-Kolonne unter Feuchtigkeitsausschluß destilliert. Die Aufbe-

wahrung der destillierten Flüssigkeiten erfolgt über Molsieb (3 bzw. 4 Å; Fa. Merck)
Die Aminosäuren werden von folgenden Firmen bezogen: Merck, Ajinomoto, Japan; Fluka, Serva und Senn-Chemicals
Die Aminosäurederivate: BOC-Ser(Bzl)-OH, BOC-D-Tyr(Bzl)-OH, BOC-His(ZTE)-OH sowie Tryptophanbenzylester sind Produkte der Fa. Fluka ebenfalls von Fluka sind N-Hydroxysuccinimid und N-Hydroxy-5-norbornen-2.3-dicarbonsäureimid.

E. Arbeitsvorschriften

Folgende Verbindungen werden nach den angegebenen Literaturstellen synthetisiert:
tert.-Butyloxycarbonylazid (BOC-Azid) aus Carbazinsäure-tert.-butylester und Natriumnitrit in Essigsäure[203]
Benzyloxycarbonylchlorid aus Benzylalkohol und Phosgen[204]
1-Hydroxybenzotriazol[205] aus o-Nitrochlorbenzol und Hydrazinhydrat.

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten BOC-Aminosäuren werden am pH-Stat in einem Dioxan/Wasser-Gemisch (1:1) aus der entsprechenden Aminosäure und BOC-Azid mit Natriumhydroxid auf die in der Literatur[206] angegebenen Werte titriert und nach beendeter Reaktion wie dort beschrieben aufgearbeitet. Umkristallisation erfolgt aus Essigester/Petrolether.

Aminosäure	pH	Ausb. (%)	Fp. (^{o}C)	$\{\alpha\}_D$ (c=1)
BOC-Gly-OH	10	92	75	-
BOC-β-Ala-OH	10	95	78	-
BOC-γ-Abu-OH	10	95	61	-
BOC-Tyr(Bzl)-OH	9.8	90	106-108	+5.0(HAc)
BOC-Tyr(DCB)-OH[195]	10	72	110	+20.2(c=2, EtOH)
BOC-Phe-OH	10.1	89	85	-3.6(HAc)
BOC-Pro-OH	9	70.2	133-135	-65.1(HAc)
BOC-Trp-OH	9.8	89	132-134	-19.3(DMF)
BOC-Met-OH	9.7	85	136*	-10.7(c=2, MeOH)

*= DCHA-Salz

Tabelle 16: Physikalische Daten der dargestellten BOC-Aminosäuren

N-Benzyloxycarbonyl-L-prolin (Z-Pro-OH)

Z-Pro-OH wird analog Referenz 207 dargestellt. Ansatz:

30 g L-Prolin, 31,2 ml Benzyloxycarbonylchlorid

Ausbeute: 52 g (83 % d. Th.)

Fp.: 70-71^{o}C Lit.: 73-75 ^{o}C

Rf_D: 0.76

$\{\alpha\}_D$: -40.0 (c=2, EtOH) Lit.: -40.6

$C_{13}H_{15}NO_4$ (249.27)

Glycinmethylester-hydrochlorid (H-Gly-OMe.HCl)

H-Gly-OMe.HCl wird nach der Thionylchlorid-Methode nach Zitat 208 hergestellt. Ansatz: 37.5 g Glycin, 65.5 g Thionylchlorid.

Ausbeute: 57.7 g (92 % d. Th.)

Fp.: 180° C Lit.: 175° C

Rf_A: 0.60

$C_3H_8NO_2Cl$ (125.56)

N-Benzyloxycarbonyl-prolyl-glycin-methylester (Z-Pro-Gly-OMe)

24.92 g Z-Pro-OH werden zusammen mit 13.5 g HOBt in 25 ml DMF gelöst und auf 0° C gekühlt. Nach Zugabe von 20.6 g Dicyclohexylcarbodiimid rührt man eine Stunde bei dieser Temperatur. Nach zugabe von 12.55 g H-Gly-OMe.HCl und 11 ml N-Methylmorpholin wird weitere zwei Stunden bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffes wird das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung, 1 N Citronensäure und Wasser je dreimal gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat entfernt man den Essigester im Vakuum. Man erhält das gewünschte Dipeptid als Öl.

Ausbeute: 26.7 g (83.3 % d. Th.)

Der gleiche Ansatz nach der gemischten Anhydrid-Methode unter Verwendung von Chlorameisensäureisobutylester ergibt eine Ausbeute von 3o.0 g (93.6 % d. Th.)

Rf_D: 0.54

$\{\alpha\}_D$: -53.1 (c=1.02, MeOH)

$C_{16}H_{20}N_2O_5$ (320.35)

Prolyl-Glycin-methylester-hydrochlorid (H-Pro-Gly-OMe.HCl)

26.7 g Z-Pro-Gly-OMe werden in 150 ml Methanol/50 ml Wasser gelöst mit 1.5 g Palladium/Aktivkohle versetzt und unter Titration mit 1 N HCl , wobei ein pH-Wert von 5 eingehalten wird, mit Wasserstoff im Durchfluß hydriert. Reaktionsdauer etwa 2 Stunden. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird die Reaktionslösung im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Man erhält eine sirupöse Substanz, die nach Verreiben mit Petrolether fest wird.

Ausbeute: 16.65 g (89.7 % d. Th.)

Fp.: 158-160° C

Rf_D: 0.29

$\{\alpha\}_D$: -42.0 (c=1, MeOH)

$C_8H_{15}N_2O_3Cl$(222. 67)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-arginin (Z-Arg-OH)

Z-Arg-OH wird nach Vorschrift 210 synthetisiert. Ansatz:

63 g L-Arginin-hydrochlorid

Ausbeute: 78.2 g (84.1 % d. Th.)

Fp.: 180° C (Z.) Lit.: 184° C

$\{\alpha\}_D$: -8.9 (c=2, 1 N HCl) Lit.: -9.3 (c=2, 1 N HCl)

$C_{14}H_{20}N_4O_4$ (308.34)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginin-Dicyclohexylammoniumsalz (Z-Arg(Mbs)-OH.DCHA)

Z-Arg(Mbs)-OH.DCHA wird nach Vorschrift 115 synthetisiert.

Ansatz: 43.0 g Z-Arg-OH, 57.6 g Mbs-Cl

Ausbeute: 40.17 g (42.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.34 Rf_A: 0.66

Fp.: 108° C Lit.: 110-112°C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +4.4 (c=1.35, MeOH)

$C_{33}H_{49}N_3O_7S.CH_3CN$ (672.89)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ω}p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinmethylester (Z-Arg(Mbs)-Pro-Gly-OMe)

24.9 g Z-Arg(Mbs)-OH werden zusammen mit 7.96 g HOBt in 75 ml DMF gelöst und auf -5° C gekühlt. Nach Zugabe von 10.72 g DCCI rührt man eine Stunde bei 0° C und gibt dann 10.81 g H-Pro-Gly-OMe.HCl und 6.09 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Absaugen des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffes wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und mit Natriumhydrogencarbonatlösung (5 %), Citronen-

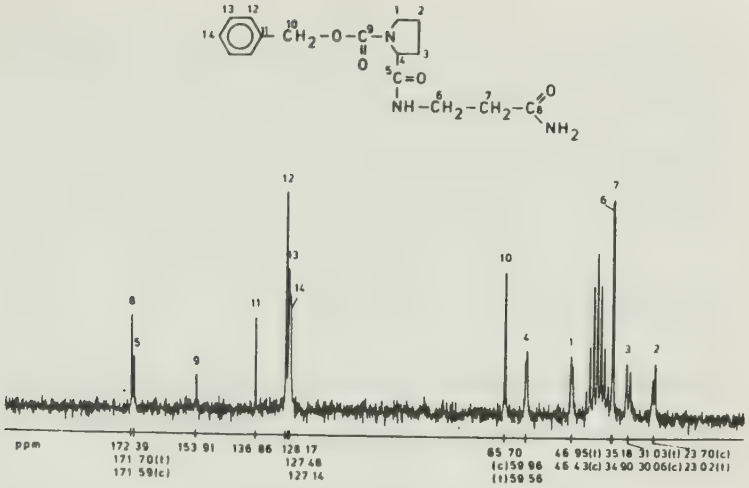


Abbildung 78: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Pro-β-Ala-NH_2, 360 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 6200 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

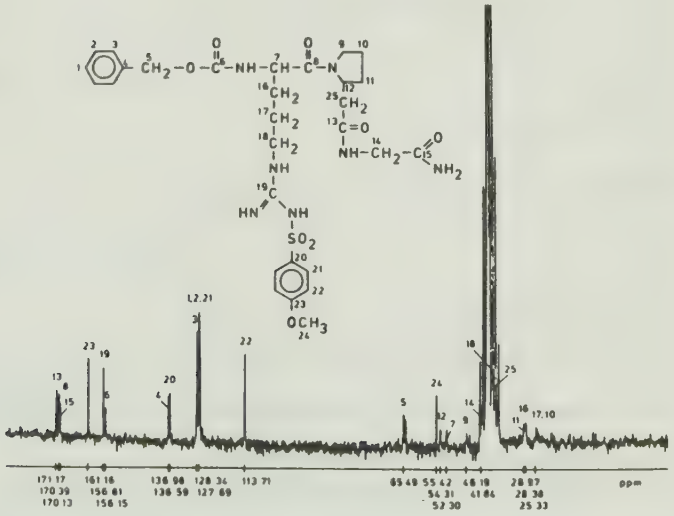


Abbildung 79: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2, 32 379 Pulsinterferogr., 250 mg in 1.5 ml DMSO

säure (1 N), und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. In fester Form erhält man das Produkt durch Kristallisation aus Methylenchlorid/Ether.

Ausbeute: 32.0 g (95 % d. Th.)

Rf_D: 0.56

Fp.: 85-88° C

$C_{29}H_{38}N_6O_8S$ (646.72)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (Z-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2)

32.7 g Z-Arg(Mbs)-Pro-Gly-OMe werden in 150 ml Methanol gelöst und bei -5° C mit Ammoniak-Gas gesättigt. Man rührt vier Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird der Rückstand um noch vorhandenen Ammoniak zu entfernen, noch zweimal in Methanol augenommen. Das Produkt erhält man schließlich aus Methylenchlorid/Ether.

Ausbeute: 26.4 g (82.6 % d. Th.)

Rf_D: 0.46

Fp.: 137° C

$C_{28}H_{37}N_7O_8S$ (631.71)

N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (H-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2·HCl)

17 g Z-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2 werden in 100 ml Methanol/10

ml Wasser gelöst, mit 1 g Palladium/Aktivkohle versetzt und im Durchfluß mit Wasserstoff, unter Aufrechterhaltung eines pH-Wertes von 4.5, mit 1 N HCl (pH-Stat) hydriert. Nach beendeter Reaktion wird der Katalysator abfiltriert, die Reaktionslösung zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird aus Methanol/Ether kristallin erhalten.

Ausbeute: 12.6 g (87.7 % d. Th.)

Rf_A: 0.30

Fp.: 92-94° C

$C_{20}H_{32}N_7O_6SCl$ (534.04)

L-Leucinmethylester-hydrochlorid (H-Leu-OMe.HCl)

H-Leu-OMe.HCl wird nach der Thionylchloridmethode nach Literatur 211 hergestellt. Ansatz: 19.6 g L-Leucin, 11.85 ml Thionylchlorid, 45 ml Methanol

Ausbeute: 25 g (92.1 % d. Th.)

Rf_D: 0.52

Fp.: 147° C Lit: 153° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +20.1 (c=1, MeOH) Lit: +12.7 (c=2, H_2O)[211]

$C_7H_{16}NO_2Cl$ (181.66)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-L-leucinmethylester (BOC-Gly-Leu-OMe)

17.5 g BOC-Gly-OH werden zusammen mit 13.5 g HOBt in 75 ml DMF gelöst und nach Kühlung auf -5° C mit 20.6 g DCCI

versetzt; man rührt den Ansatz bei dieser Temperatur eine Stunde und gibt dann 18.2 g H-Leu-OMe.HCl und 11 ml N-Methylmorpholin hinzu. Nach zweistündigem Rühren bei 0^{o} C und über Nacht bei Raumtemperatur, saugt man vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und mit Natriumhydrogencarbonatlösung, Citronensäure und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels erhält man ein farbloses Öl.

Ausbeute: 28.75 g (93.5 % d. Th.)

Rf_D: 0.52

$\{\alpha\}_D^{20}$: -19.7 (c=1.04, MeOH)

Der analoge Ansatz nach der DCCI/N-Hydroxysuccinimid-Methode gekuppelt ergibt eine Ausbeute von 88.3 % d. Th.

$C_{14}H_{26}N_2O_5$ (302.37)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-L-leucin (BOC-Gly-Leu-OH)

28.75 g BOC-Gly-Leu-OMe werden in 200 ml Methanol gelöst und innerhalb von einer Stunde tropfenweise mit 50 ml 2 N Natronlauge versetzt. Nach beendeter Verseifung wird mit 2 N Salzsäure neutralisiert, das Methanol im Vakuum entfernt und der Rückstand zwischen Essigester und 2 N Citronensäure verteilt. Die wässrige Citronensäurelösung wird noch zweimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser neutral gewaschen und

über Natriumsulfat getrocknet. Die Substanz erhält man aus Essigester/Petrolether (30-50° C)

Ausbeute: 20.8 g (75.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.42

$\{\alpha\}_D^{20}$: -10.7 (c=1, MeOH)

$C_{13}H_{24}N_2O_5$ (288.34)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxy-benzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (BOC-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2)

14.71 g BOC-Gly-Leu-OH werden zusammen mit 7.81 g HOBt in 75 ml DMf gelöst auf -5°C gekühlt und mit 10.52 g DCCI versetzt. Nach einstündigem Rühren bei dieser Temperatur gibt man 27.24 g H-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2.HCl und 5.61 ml N-Methyl morpholin hinzu, rührt zwei Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach üblicher Aufarbeitung wird der Rückstand in wenig Methylenchlorid aufgenommen und unter Rühren in eiskalten Ether eingetropft, der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit kaltem Ether gewaschen und über Calciumchlorid getrocknet.

Ausbeute: 32.43 g (82.7 % d. Th.)

Rf_D: 0.54

Fp.: 117-119° C

$C_{33}H_{53}N_9O_{10}S$ (767.91)

Glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxbenzolsulfonyl-Larginyl-L-prolyl-glycinamid-hydrochlorid (H-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2.HCl)

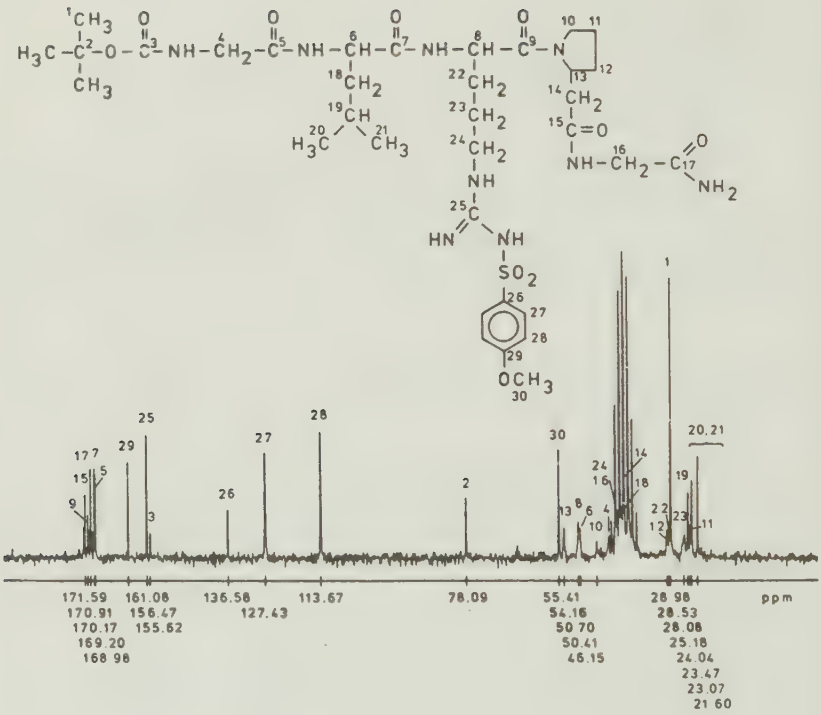


Abb. 80: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2, 170 mg in DMSO-d_6, 21 000 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

19 g der BOC-geschützten Verbindung werden in 100 ml 1.2 N HCl/Essigsäure bei Raumtemperatur 50 min. gerührt. Die so erhaltene Lösung wird unter Rühren in 1.5 l eiskalten Ether eingetropft. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit eiskaltem Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid im Exiccator getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 15.1 g (86.6 % d. Th.)

Rf_D: 0.12

Fp.: 151-155° C

$C_{28}H_{46}N_9O_8SCl$ (704.25)

O-Benzyl-L-tyrosin (H-Tyr(Bzl)-OH)

Diese Verbindung wird nach Literatur 212 über den Kupferkomplex mit Benzylbromid hergestellt. Ansatz: 72.4 g L-Tyrosin, 48.9 g $CuSO_4.5\ H_2O$, 50 ml Benzylbromid

Ausbeute: 55 g (52.6 % d. Th.)

Rf_A: 0.22

Fp.: 225-230°C Lit: 223°C

$\{\alpha\}_D^{2o}$: -9.9 (c=1, 80 % HAc) Lit: -9.9 (c=1, 80 % HAc)

$C_{16}H_{17}NO_3$ (261.32)

O-Benzyl-L-tyrosinmethylester-hydrochlorid (H-Tyr(Bzl)-OMe.HCl)

Die Synthese wird nach Literatur 212 durchgeführt. 2o g

O-Benzyl-L-Tyrosin werden in 500 ml einer mit HCl-Gas gesättigten Lösung von Methanol bis zur vollständigen Auflösung gerührt. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 20 g (81.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.77

Fp.: 184° C Lit: 181° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +10.6 (c=4, MeOH) Lit: +11.5 (c=4, MeOH)

$C_{17}H_{20}NO_3Cl$ (321.8)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-seryl-O-benzyl-L-tyrosinmethylester (BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OMe)

10.63 g BOC-Ser(Bzl)-OH werden zusammen mit 5.51 g HOBt in 75 ml DMF gelöst und auf -5° C gekühlt. Nach Zugabe von 7.42 g DCCI rührt man eine Stunde bei 0° und gibt dann 11.6 g H-Tyr(Bzl)-OMe.HCl und 3.98 ml N-Methylmorpholin hinzu. Nach Rühren des Ansatzes über Nacht wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Das feste Produkt erhält man aus Methylenchlorid/Ether.

Ausbeute: 16.5 g (81.4 % d.Th.)

Rf_D: 0.76

$C_{32}H_{38}N_2O_7$ (562.66)

Die analoge Kupplung mit DCCI/N-Hydroxysuccinimid ergibt 84.44 % Ausbeute.

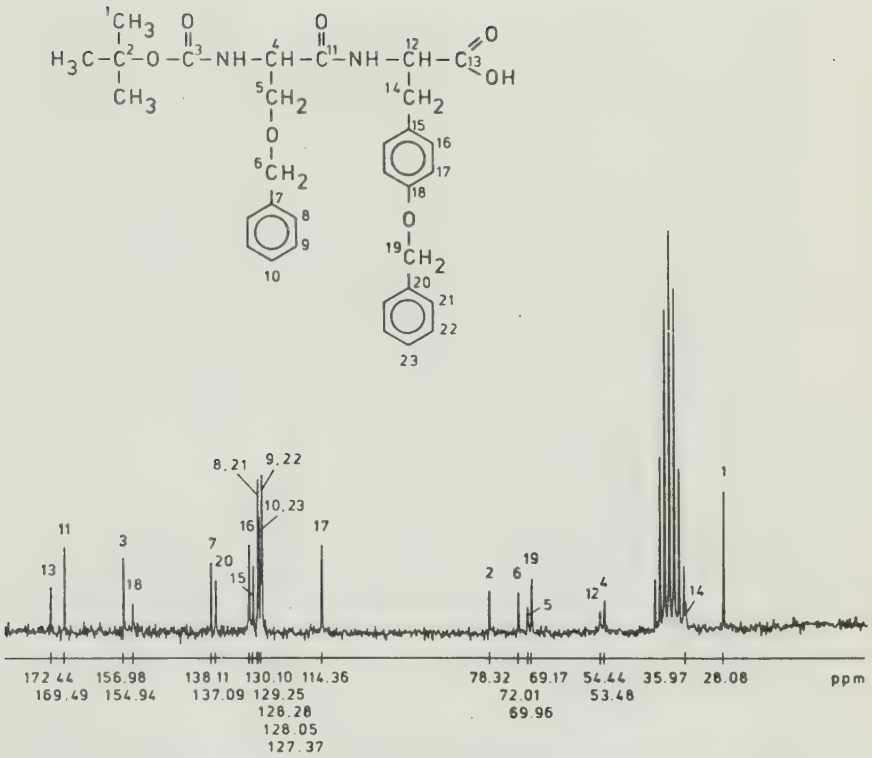


Abb. 81: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH, 250 mg in 1ml DMSO-d_6, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 8951 Pulsinterferogramme

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosin (BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH)

16 g BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OMe werden in 150 ml Dioxan/30 ml Wasser gelöst. Man rührt die Lösung unter tropfenweiser Zugabe von 25 ml 2 N NaOH, Verseifungszeit etwa 2 Stunden. Nach beendeter Verseifung wird die Lösung mit 2 N HCl unter Kühlung neutralisiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand zwischen Essigester und 2 N Citronensäure verteilt. Die organische Phase wird mit Wasser neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Petrolether (30-50°).

Ausbeute: 14.85 g (95.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.52

Fp.: 72° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +13.7 (c=1, MeOH)

$C_{31}H_{36}N_2O_7$ (548.64)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2)

14.81 g BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH und 3.11 g N-Hydroxysuccinimid werden in 100 ml DMF gelöst und nach Kühlung auf -5° C mit 5.56 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde bei dieser Temperatur gibt man 19.02 g H-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-

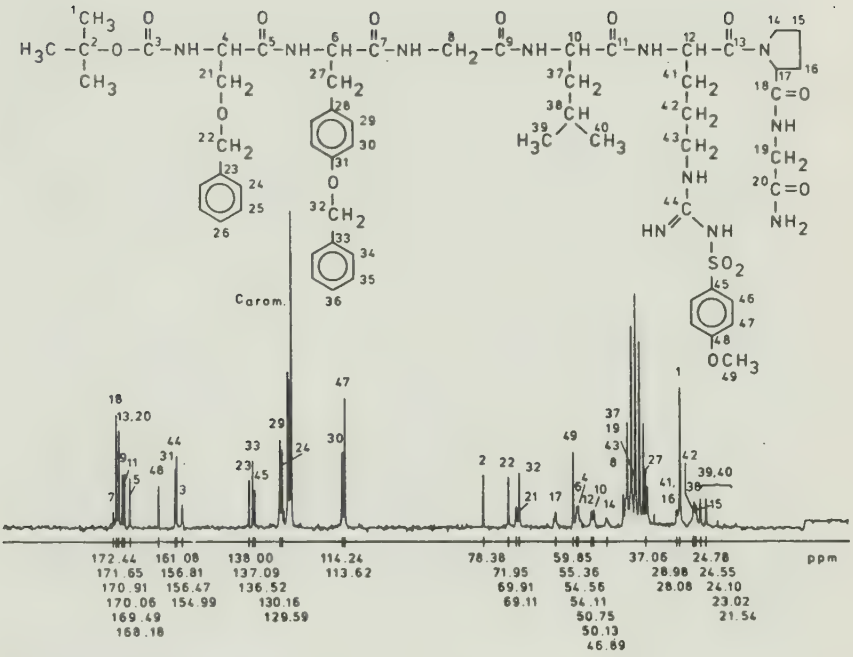


Abb. 82: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2, 200 mg in 1 ml DMSO-d_6, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 68 184 Pulsinterferogramme

Gly-NH_2.HCl und 3.23 ml N-Methylmorpholin hinzu. Der Reaktionsansatz wird 2 Stunden bei 0^o C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend nach Abfiltrieren des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffes im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in Essigester/n-Butanol aufgenommen und mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung, 1 N Citronensäure und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Produkt erhält man aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 19.1 g (59.1 % d. Th.)

Rf_D: 0.46

Fp.: 117-119° C

$C_{59}H_{79}N_{11}O_{14}S$ (1198.41)

O-Benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydrochlorid (H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2.HCl)

8.6 g BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2 werden mit 100 ml 1.2 N HCl/Essigsäure übergossen und eine Stunde bei RT gerührt. Die so erhaltene Lösung wird in 500 ml eiskalten Ether unter Rühren eingetropft. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt und über festem KOH getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 6.71 g (82.4 % d. Th.)

Rf_A: 0.47

Fp.: 161° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: -35.7 (c=1, MeOH)

$C_{54}H_{72}N_{11}O_{12}SCl$ (1134.75)

N^{α}-tert.-Butyloxycarbonyl-N^{im}-(1-benzyloxycarbonylamino-2.2.2-trifluorethyl)-L-histidyl-L-tryptophanbenzylester (BOC-His(ZTE)-Trp-OBzl)

4.86 g BOC-His(ZTE)-OH werden zusammen mit 1.15 g N-Hydroxysuccinimid in 50 ml DMF gelöst und auf -5° C gekühlt. Nach Zugabe von 2.06 g DCCI wird eine Stunde bei 0° gerührt und dann 3.31g H-Trp-OBzl.HCl und 1.1 ml N-Methylmorpholin hinzugegeben. Man rührt den Ansatz weitere zwei Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur. Die Aufarbeitung erfolgt wieüblich. Das Produkt erhält man aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 4.75 g (62.6 % d.Th.)

Rf_A: 0.90 Rf_D: 0.64

Fp.: 97-102° C

$C_{39}H_{41}O_6O_7F_3$ (762.79)

N^{α}-tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-L-tryptophan (BOC-His-Trp-OH)

4.5 g BOC-His(ZTE)-Trp-OBzl werden in 75 ml Methanol, dem einige Tropfen Essigsäure zugegeben werden, gelöst, mit 500 mg Palladium/Aktivkohle versetzt und im Durchfluß mit Wasserstoff hydriert. Nach beendeter Reaktion wird vom

Katalysator abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingeengt. Nach Zusatz von Ether erhält man die gewünschte Verbindung als Niederschlag. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 2.2 g (84.6 % d. Th.)

Rf_A: 0.44

Fp.: 190-195° C (Z.)

$C_{22}H_{27}N_5O_5$ (441.49)

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutaminsäure-Dicyclohexylammoniumsalz (Z-Pyr-OH.DCHA)[214]

Zu einer Lösung von 13.1 g des aus N-Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure[215] nach Vorschrift 213 gewonnenen Z-Glutaminsäureanhydrids in 25 ml absolutem Tetrahydrofuran und 40 ml Ether wird unter Rühren 10 ml Dicyclohexylamin in 20 ml Ether zugetropft. Nach Stehenlassen über Nacht saugt man den gebildeten Niederschlag ab, wäscht mit eiskaltem Ether und trocknet über Calciumchlorid. Umkristallisiert wird aus Chloroform/Ether.

Ausbeute: 17.8 g (81 % d. Th.)

Rf_A: 0.50

Fp.: 195-197° C Lit: 199-200° C[214]

$[\alpha]_D^{20}$: -16.8 (c=3, $CHCl_3$) Lit: -17.4 (c=3.11, $CHCl_3$)

$C_{25}H_{36}N_2O_5$ (444.6)

N-Benzyloxycarbonyl-pyroglutaminsäure-N-Hydroxysuccinimidester (Z-Pyr-OSu)[214]

In eine Lösung von 11.54 g aus Z-Pyr-OH.DCHA-Salz freigesetzter Z-Pyroglutaminsäure in 60 ml 1.2-Dimethoxyethan werden 5.6 g N-Hydroxysuccinimid und 9.94 g DCCI bei -5° hinzugegeben. Man rührt 2 Stunden in der Kälte und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Absaugen des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffes wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 12.5 g (79.0 d. Th.)

Fp.: 129-131° C Lit: 131-132° C[214]

Rf_D: 0.66

$\{\alpha\}_D^{20}$: -21.8 (c=1, DMF) Lit: -23 (c=1.8, DMF)

$C_{17}H_{16}O_7N_2$ (360.31)

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-L-histidin (Z-Pyr-His-OH)

Nachdem man 13.5 g Z-Pyr-OSu in 25 ml Dioxan gelöst hat, fügt man unter Rühren Histidin-Natriumsalz hinzu, das aus 6.42 g L-Histidin und 5.15 g Natriumcarbonatpentahydrat in 50 ml Wasser hergestellt wurde. Der Reaktionsansatz wird 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wird auf etwa 25 ml eingeengt. Nach Neutralisation wird auf ein Volumen von 20 ml gebracht. Der sich bil-

dende Niederschlag wird abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet. Nach Umkristallisation aus 30 %igem wäßrigem Methanol erhält man die Substanz analysenrein.
Ausbeute: 8.5 g (56.7 % d.Th.)
Rf_A: 0.45
Fp.: 143-145°C Lit: 149° C[216]
$\{\alpha\}_D^{20}$: -4,0 (c=1, MeOH) Lit: -1.0 (c=1.08, DMF)[216]
$C_{19}H_{20}N_4O_6$ (400.40)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-histidyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-Obenzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arinyl-L-prolyl-glycinamid (BOC-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2)

Nachdem man 2.15 g BOC-His-Trp-OH zusammen mit 0.65 g HOBt in 50 ml DMF gelöst hat, kühlt man auf -5° C ab und gibt 1 g DCCI hinzu. Der Ansatz wird eine Stunde bei 0° gerührt, dann gibt man 5.34 g H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2.HCl hinzu. Nach Zugabe von 0.53 ml N-Methylmorpholin rührt man 2 Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur, saugt den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der verbliebene Rückstand wird in Essigester/n-Butanol (8:1) aufgenommen und wie üblich gewaschen; die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Kristallisation erfolgt aus DMF/Ether.
Ausbeute: 6 g (80.9 % d. Th.)

Rf_D: 0.58

Fp.: 146-148° C

$C_{76}H_{96}N_{16}O_{16}S$ (1521.76)

L-Histidyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydrochlorid (H-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2.HCl)

5 g BOC-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2 werden mit 1 ml Anisol und 0.5 ml Ethandithiol versetzt und unter Stickstoffatmosphäre mit 100 ml 1.2 N HCl/Essigsäure übergossen und eine Stunde bei Raumtemreatur gerührt. Nach DC-Überprüfung wird die erhaltene Lösung unter Rühren in 600 ml eiskalten Ether getropft. Der erhaltene Niederschlag wird abgesaugt, mit eiskaltem Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Umfällung erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 4.28 g (87.3 % d.Th.)

Rf_A: 0.38

Fp.: 169-170° C

$C_{71}H_{90}N_{16}O_{14}SCl_2$ (1494.57)

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (Z-Pyr-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2)

0.72 g Z-Pyr-OSu und 3 g H-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2.HCl werden zusammen mit 4.4 ml N-Methylmorpholin in 50 ml DMF gelöst, mit einer Spatelspitze HOBt als Katalysator versetzt und 36 Stunden bei RT gerührt. Die so erhaltene Lösung wird im Vakuum vom DMF befreit, der Rückstand in Essigester/n-Butanol gelöst und wie üblich gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Produkt erhält man aus DMF/Ether.

Ausbeute: 2.63 g (78.7 % d. Th.)

Rf_D: 0.42 Fp.: 141-145° C (Z.)

$C_{84}H_{99}N_{17}O_{18}S$ (1666.88)

L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydroacetat (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2.HAc)

1 g Z-Pyr-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2 werden mit je 0.5 ml Anisol und Ethandithiol versetzt und in einer HF-Apparatur mit 25 ml über Kobalttrifluorid getrocknetem verflüssigten Fluorwasserstoff bei 0° C eine Stunde gerührt. Der Fluorwasserstoff wird nach beendeter Reaktion durch Stickstoff verdrängt. Der Rückstand wird über festem KOH getrocknet um letzte Reste Fluorwasserstoff zu entfernen. Anschließend wird in 0.1 N Essigsäure aufgenommen und dreimal mit Ether ausgeschüttelt. Durch Behandlung der wässrigen Phase mit 5 g DOWEX-

1 X 4-Anionenaustauscher (serva) (Acetatform) überführt man das entstandene Hydrofluorid in das entsprechende Acetat. Die so erhaltene Lösung wird lyophilisiert. Die chromatographische Reinigung erfolgt im ersten Schritt durch Verteilungschromatographie an Sephadex G 25 fein mit der Oberphase des Elutionsmittelsystems n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) nachdem die Säule mit der Unterphase des Systems äquilibriert wurde. Um letzte Verunreinigungen zu entfernen,wird die erhaltene Substanz durch Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose (Serva) mit Ammoniumacetat in einem Konzentrationsgradienten von 0.01 - 0.3 M und einem pH-Gradienten von 4.8 - 7.0 chromatographiert. die erhaltene Lösung wird mehrmals lyophilisiert um das Ammoniumacetat quantitativ zu entfernen.

Ausbeute: 195 mg (26.2 % d.Th.)

Rf_A: 0.32

Fp.: 215°C

$\{\alpha\}_D^{20}$: -47.5 (c=1. 1 % HAc)

Aminosäureanalyse:

Glu	His	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro
1.08	1.0	0.84	1.0	1.62	1.0	1.0	1.0

$C_{57}H_{79}N_{17}O_{15}$ (1242.36)

N-Benzyloxycarbonyl-L-prolyl-glycinamid (Z-Pro-Gly-NH_2)

15 g Z-Pro-Gly-OMe werden in 100 ml Methanol gelöst und bei 0° C unter Rühren mit Ammoniak gesättigt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt und ist nach etwa 5 h

beendet. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird aus Essigester/Petrolether kristallisiert.

Ausbeute: 12.6 g (88.1 % d. Th.)

Rf_D: 0.78

Fp.: 137° C

$C_{15}H_{19}N_3O_4$ (305.33)

L-Prolyl-glycinamid-hydrobromid (H-Pro-Gly-NH_2.HBr)

10 g Z-Pro-Gly-NH_2 werden in 50 ml Essigsäure suspendiert und mit 60 ml HBr/Essigsäure (33 %) übergossen. Nach einstündigem Rühren bei Raumtemperatur wird die Lösung in 500 ml eiskalten Ether getropft. Der Niederschlag wird mit Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid getrocknet.

Ausbeute: 10.1 g (92.6 % d. Th.)

Rf_D: 0.1

$C_7H_{14}N_3O_2Br$ (252.12)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (Z-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2)

4.78 g Z-Arg(Mbs)-OH werden zusammen mit 1.15 g N-Hydroxysuccinimid in 50 ml DMF gelöst, auf -5° C gekühlt und mit 2.06 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde setzt man 3.33 g H-Pro-Gly-NH_2.HBr hinzu und rührt 2 h bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur. Die Aufarbeitung des Ansatzes

erfolgt wie weiter oben beschrieben. Das Produkt zeigt analoge physikalische Daten wie die zuvor beschriebene Substanz.

Ausbeute: 4.7 g (74.4 % d. Th.)

Chlorphosphorsäurediphenylester

Die Reaktion wird nach Vorschrift 217 durchgeführt. Ansatz: 250 g Phosphoroxichlorid, 230g Phenol., Erhitzen 10 h.

Ausbeute: 158.5 g (73 % d. Th.)

$Kp._{9-10}$: 185° C Lit: 191-194° C (12)

n_D: 1.5487

$C_{12}H_{10}O_3PCl$ (268.64)

Azidophosphorsäurediphenylester (DPPA)

Ansatz: 155 g Chlorphosphorsäurediphenylester, 42 g Natriumazid in 250 ml absolutem Aceton bei Raumtemperatur über Nacht.

Ausbeute: 135 g (85 % d. Th.)

$Kp_{0.6-1.0}$:140-143° C

n_D: 1.5517

$C_{12}H_{10}N_3O_3P$ (275.20)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-glycinmethylester (BOC-Pro-Gly-OMe)

21.5 g BOC-Pro-OH werden zusammen mit 13.5 g HOBt in 75 ml Methylenchlorid gelöst und auf -5° C gekühlt. Nach Zugabe von 12.55 g H-Gly-OMe.HCl und 11 ml N-Methylmorpholin rührt man zwei Stunden bei 0° und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht. Die Aufarbeitung erfolgt wie üblich. Man erhält die Substanz als Öl.

Ausbeute: 14.9 g (53.4 % d. Th.)

Rf_D: 0.59

$C_{13}H_{22}N_2O_5$ (286.33)

β-Alaninmethylester-hydrochlorid (H-β-Ala-OMe.HCl)

Das Produkt wird nach der Thionylchloridmethode nach Vorschrift 208 synthetisiert. Ansatz: 26.7 g , 91 ml Methanol, 24.2 ml Thionylchlorid. Umkristallisation aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 38.5 g (97 % d. Th.)

Rf_A: 0.31

Fp.: 104° C

$C_4H_{10}NO_2Cl$ (139.58)

N-Benzyloxycarbonyl-L-prolyl-β-Alaninmethylester (Z-Pro-β-Ala-OMe)

12.46 g Z-Pro-OH werden zusammen mit 7.01 ml Triethylamin in 75 ml abs. Chloroform gelöst und auf -30° C gekühlt. Nachdem man unter Rühren 6.5 ml Chlorameisensäureisobutyl-

ester hinzugetropft hat, rührt man noch 15 min. bei dieser Temperatur und gibt dann 6.98 g H-β-Ala-OMe.HCl und 7.01 ml Triethylamin hinzu, rührt 2 Stunden bei 0^{o} C und über Nacht bei RT. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird in Essigester aufgenommen und nacheinander mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung, 1 N Citronensäure und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels verbleibt die Substanz als Öl.

Ausbeute: 16.2 g (96.9 % d. Th.)

Rf_D: 0.76

$[\alpha]_D^{20}$: -45.4 (c=1, MeOH)

$C_{17}H_{22}N_2O_5$ (334.37)

Mit Hilfe der DPPA-Kupplungsmethode erhält man aus 16.97 g Z-Pro-OH, 9.5 g H-β-Ala-OMe.HCl, 18.73 g DPPA und 15 ml N-Methylmorpholin in DMF 14.45 g (63.7 % d. Th.) Öl mit identischen physikalischen Daten.

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-β-alaninmethylester (BOC-Pro-β-Ala-OMe)

8.61 g BOC-Pro-OH werden mit 6.12 g HOBt in 50 ml Methylenchlorid gelöst und auf -5^{o} C gekühlt. Nach Zugabe von 6.12 g DCCI und 5.58 g H-β-Ala-OMe.HCl sowie 4.4 ml N-Methylmorpholin rührt man zwei Stunden bei 0^{o} C und über Nacht bei RT und filtriert den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie üblich gewaschen u. getrocknet.

Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man die Substanz als Öl.

Ausbeute: 6.7 g (55.7 % d. Th.)

Rf_D: 0.66

$C_{14}H_{24}N_2O_5$ (300.36)

L-Prolyl-β-alaninmethylester-hydrochlorid (H-Pro-β-Ala-OMe.HCl)

15.5 g Z-Pro-β-Ala-OMe werden in 100 ml Methanol gelöst, mit 1 g Palladium/Aktivkohle versetzt und nach Verdrängen der Luft mit Stickstoff, mit Wasserstoff im Durchfluß hydriert, dabei wird mit dem pH-Stat mit 1 N HCl ein pH-Wert von 4.5 aufrechterhalten. Nach beendeter Reaktion wird vom Katalysator über Cellite abfiltriert. Die Substanz erhält man als Öl nach Entfernen des Lösungsmittels.

Ausbeute: 10 g (91.1 % d. Th.)

Rf_D: 0.28

$C_9H_{17}N_2O_3Cl$ (236.70)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninmethylester (Z-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-OMe)

20.21 g Z-Arg(Mbs)-OH werden in 100 ml DMF gelöst, auf $-5^{o}C$ gekühlt und dann mit 12.8 g DPPA und 4.64 ml N-Methylmorpholin versetzt. Nach 30 min gibt man 10 g H-β-Ala-OMe. HCl und nochmals 4.64 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere 2 Stunden bei 0^{o} und über Nacht bei Raumtempera-

tur. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird in Essigester aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Die Substanz erhält man aus Methylenchlorid/Ether.

Ausbeute: 19.8 g (70.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.43

Fp.: 71°C

$C_{30}H_{40}N_6O_9S$ (660.75)

Der gleiche Ansatz nach der DCCI/HOBt-Methode gekuppelt (8.71 g DCCI/6.47 g HOBt) ergibt 23 g (82.3% d.Th.)Produkt.

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid (Z-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2)

22 g Z-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-OMe werden in 100 ml Methanol gelöst und bei -5° C mit Ammoniak gesättigt, man rührt 4 Stunden bei 0° und anschließend bis zur quantitativen Umsetzung (3 d). Nach Entfernen des Lösungsmittels wird aus Methanol/Ether kristallisiert.

Ausbeute: 17.75 g (82.5 % d. Th.)

Rf_D: 0.52

Fp.:108-110° C

$C_{29}H_{39}N_7O_8S$ (645.74)

N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid-hydrochlorid (H-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl)

17.08 g Z-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2 werden in 100 ml Metha-

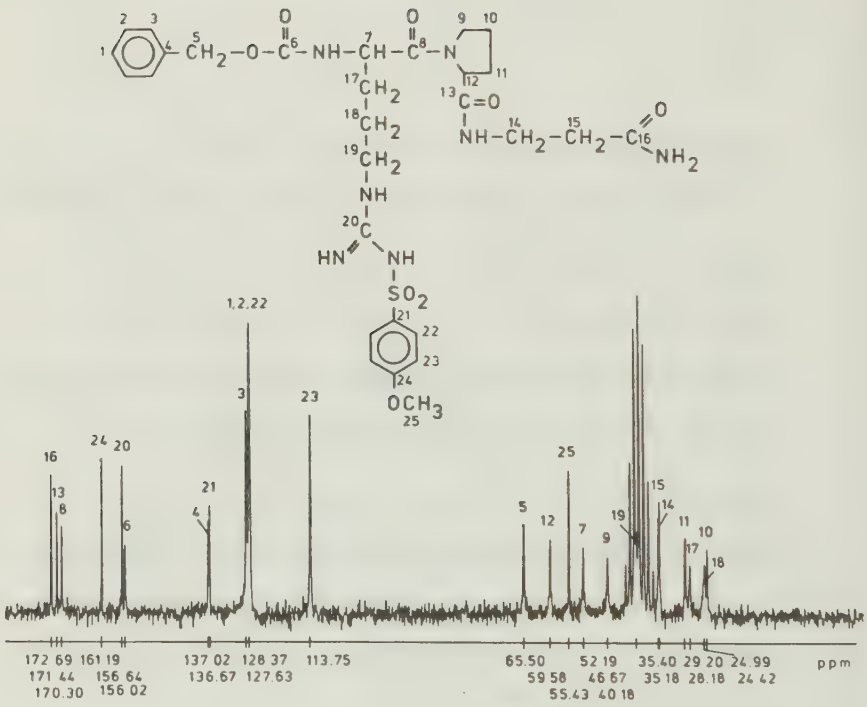


Abb. 83: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2, 220 mg in 1 ml DMSO-d_6, 5300 Pulsinterferogramme, protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz

nol, dem 20 ml Wasser hinzugegeben werden, gelöst, mit 1 g Palladium/Aktivkohle versetzt und bei pH 4.5, der mit 1 N HCl mit einem pH-Staten aufrechterhalten wird, mit Wasserstoff hydriert. Reaktionsdauer etwa 2 Stunden. Nach Abfiltrieren des Katalysators über Cellite wird das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird aus Methanol/Ether umkristallisiert.

Ausbeute: 13.2 g (91 % d. Th.)

Rf_A: 0.16

Fp.: 80° C

$C_{21}H_{34}N_7O_6SCl$ (548.06)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid (BOC-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2)

2.88g BOC-Gly-Leu-OH werden zusammen mit 1.1 ml N-Methylmorpholin in 75 ml DMF und auf -5° C gekühlt. Nach Zugabe von 2.75 g DPPA rührt man 30 min bei 0° und gibt dann 5.48 g H-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl und 1.1 ml N-Methylmorpholin hinzu. Der Ansatz wird weitere 2 Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wird wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Ether.

Ausbeute: 5.2 g (66.5 % d. Th.)

Rf_D: 0.55

Fp.: 110-113° C

$C_{34}H_{55}N_9O_{10}S$ (781.93)

Glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid-hydrochlorid (H-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl)

4,5g der zuvor synthetisierten BOC-Verbindung werden mit 50 ml 1.2 N HCl/Essigsäure übergossen und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die so erhaltene Lösung wird unter Rühren in 500 ml eiskalten Ether getropft. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 4 g (96.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.15

Fp.: 151-155° C

$C_{29}H_{48}N_9O_8SCl$ (718.28)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-Obenzyl-L-seryl-Obenzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid (BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2)

2.74 g BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH werden zusammen mit 0.68 g HOBt in 50 ml DMF gelöst und auf -5° C gekühlt. Nach Zugabe von 1.03 g DCCI rührt man eine Stunde bei dieser Temperatur und gibt dann 3.59 g der Aminokomponente H-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl und 0.6 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° und über

Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffes zieht man das Lösungsmittel im Vakuum ab und nimmt den Rückstand in Essigester/n-Butanol (5:1) auf, wäscht nacheinander mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung, 0.5 N Citronensäure und Wasser. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Auf Zugabe von Petrolether erhält man die Substanz in festem Zustand.

Ausbeute: 2.8 g (46.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.46

Fp.: 117-119° C

$C_{60}H_{81}N_{11}O_{14}S$ (1212.44)

O-Benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid-hydrochlorid (H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl)

2,5 g BOC-Heptapeptidamid werden in 10ml Essigsäure gelöst und mit 40 ml 1.2 N HCl/Essigsäure versetzt und bei Raumtemperatur eine Stunde gerührt. Die erhaltene Lösung tropft man unter Rühren in 200 ml eiskalten Ether. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 2.12 g (89.4 % d. Th.)

Rf_D: 0.49

Fp: 161° C

$C_{55}H_{74}N_{11}O_{12}SCl$ (1148.78)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tryptophan-2.4.5-trichlorphenylester (BOC-Trp-OCP)[218]

10.21 g BOC-Trp-OH werden in 200 ml Essigester gelöst, mit 9.88 g 2.4.5-Trichlorphenol versetzt und auf -5° C gekühlt, nach Zugabe von 10.3 g DCCI rührt man weitere zwei Stunden bei dieser Temperatur und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffes erhält man das Produkt auf Zugabe von Petrolether. Umkristallisation erfolgt aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 21.8 g (90.1 % d. Th.)

Rf_D: 0.81

Fp.: 130-131° C Lit: 132-133° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: -29.1 (c=1, DMF) Lit: -30.5 (c=1, DMF)

$C_{22}H_{21}N_2O_4Cl_3$ (483.78)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid (BOC-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2)

0.73 g BOC-Trp-OCP werden zusammen mit 1.72 g H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl in 25 ml DMF gelöst. Dann werden 0.17 ml N-Methylmorpholin sowie eine Spatelspitze HOBt als Katalysator hinzugegeben. Man rührt den Ansatz 36 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, nimmt man den Rückstand in

Essigester/n-Butanol (5:1) auf, und wäscht die organische Phase wie üblich. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Methylenchlorid aufgenommen und gekühlt. Der noch vorhandene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Nach Zugabe von Ether erhält man die Substanz in fester Form.

Ausbeute: 1.6 g (75.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.61

Fp.: 162-165° C

$C_{71}H_{91}N_{13}O_{15}S$ (1398.65)

L-Tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid-hydrochlorid (H-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl)

1.26 g des zuvor hergestellten BOC-Octapeptidamids werden unter Stickstoffatmosphäre mit 40 ml 1.2 N HCl/Essigsäure übergossen, nachdem man zuvor 1 ml Ethandithiol hinzugegeben hat. Die Entacylierung wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 45 min ist die BOC-Schutzgruppe quantitativ entfernt. Die so erhaltene Lösung wird unter Rühren in 200 ml eiskalten Äther eingetropft, der gebildete Niederschlag abgesaugt , mit Ether gewaschen und über Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisiert wird aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 1.1 g (90.9 % d. Th.)

Rf_D: 0.63

Fp.: 179-180°C (Z.)

$C_{66}H_{90}N_{13}O_{13}SCl$ (1341.04)

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-L-histidyl-trypto-phyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid (Z-Pyr-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2)

0.15 g Z-Pyr-His-OH werden in 20 ml DMF gelöst, auf -5° C gekühlt und nacheinander mit 0.04 ml N-Methylmorpholin und 0.11 g DPPA versetzt. Man rührt 30 min bei dieser Temperatur und gibt dann 0.5 g der Aminokomponente und 0.04 ml N-Methylmorpholin hinzu. Nach zweistündigem Rühren bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur wird in üblicher Weise aufgearbeitet. Umkristallisation erfolgt aus DMF/Ether.

Ausbeute: 0.51g (80.9 % d. Th.)

Rf_D: 0.41

Fp.: 136-138° C

$C_{85}H_{107}N_{17}O_{18}S$ (1686.96)

L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid-hydro-acetat (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-β-AlaNH_2.HAc)

400 mg des geschützten Decapeptidamids sowie 0.25 ml Anisol und 0.25 ml

400 mg des geschützten Decapeptidamids sowie 0.25 ml Anisol und 0.25 ml Ethandithiol werden in einer Sakagibara-Apparatur mit 20 ml flüssigem über Kobalttrifluorid getrocknetem Fluorwasserstoff eine Stunde bei 0^{o} C gerührt. Nach beendeter Reaktion wird der Fluorwasserstoff durch Stickstoff verdrängt, der Rückstand über festem Kaliumhydroxid getrocknet um letzte Spuren von Fluorwasserstoff zu entfernen, dann wird in 0.1 N Essigsäure aufgenommen und dreimal mit Ether ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird mit Anionenaustauscher DOWEX 1 X 4 (Acetat-Form) versetzt. Nach Abfiltrieren des Harzes lyophilisiert man. Das so gewonnene Rohpeptid wird analog dem LH/FSH-Releasinghormon zuerst durch Verteilungschromatographie an Sephadex G 25 fein mit dem Elutionsmittelsystem n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) (Oberphase) und anschließend durch Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose (Serva) mit einem Ammoniumacetat-pH- und Ionenstärkegradienten (0.01 -0.4 M, pH 4.8 - 7.0) gereinigt.

Ausbeute: 120 mg (42.4 % d. Th.)

Rf: 0.47 (n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser: 15:10: 3:12)

Fp: 163-166^{o} C

Aminosäureanalyse:	Glu	His	Ser	Tyr	Gly	Leu
	1.07	1.06	0.83	1.0	1.08	1.0
	Arg	β-Ala	Pro			
	1.2	1.1	0.95			

$C_{56}H_{77}N_{17}O_{13} \cdot CH_3COOH$ (1256.39)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-β-alanyl-L-leucinmethylester (BOC-β-Ala-Leu-OMe)

9.45 g BOC-β-Ala-OH werden zusammen mit 7.02 ml Triethylamin in 75 ml Chloroform gelöst und mit Aceton/trockeneis auf mit -30° C gekühlt. Unter Rühren tropft man 6.83 ml Chlorameisensäureisobutylester hinzu. Nach 15 min versetzt man mit 9.08 g H-Leu-OMe.HCl und 7.02 ml Triethylamin, hält die Temperatur bei -25° C für zwei Stunden und läßt dann bei Raumtemperatur über Nacht stehen. Nach Abfiltrieren des Triethylammoniumhydrochlorids, entfernt man das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und wie üblich gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird aus Ether/Petrolether kristallisiert.

Ausbeute: 14.2 g (89.76 % d. Th.)

Rf_D: 0.55

Fp.: 57-58° C

$C_{15}H_{28}N_2O_5$ (316.40)

Der gleiche Ansatz nach der DCCI/N-Hydroxysuccinimid-Methode ergibt 11.2 g (70.8 % d. Th.), nach der DCCI/HOBt-Methode 14.01 g (88.6 % d. Th.)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-β-alanyl-L-leucin (BOC-β-Ala-Leu-OH)

27 g BOC-β-Ala-Leu-OMe werden in 100ml Dioxan/Wasser (4:1)

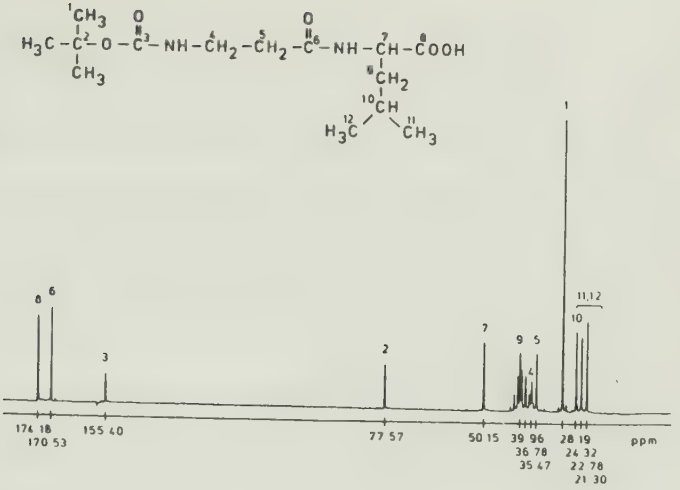


Abbildung 84: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-β-Ala-Leu-OH, 250 mg in 1.5 ml DMSO-d_6, 19 000 Pulsinterferogr., 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

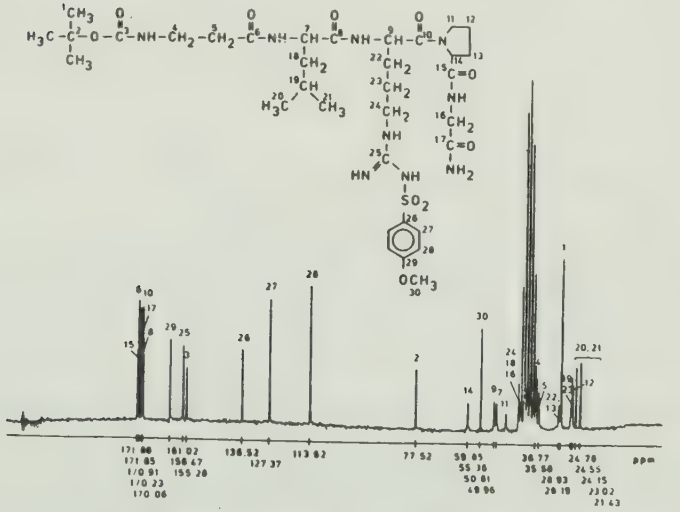


Abbildung 85: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2, 190 mg in 1 ml DMSO, 30 936 Pulsinterferogramme, protonenbreitbandentkoppelt

gelöst und unter Rühren tropfenweise mit 50 ml 2 N NaOH verseift. Nach beendeter Reaktion wird unter Kühlung mit 2 N HCl neutralisiert, das Dioxan im Vakuum entfernt und der Rückstand zwischen Essigester und 2 N Citronensäure verteilt. Nach dreimaligem Ausschütteln der wässrigen Phase mit Essigester werden die organischen Phasen vereinigt und mit Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat erhält man das Dipeptid aus Essigester/Petrolether kristallin.

Ausbeute: 22.38 g (86.7 % d. Th.)

Rf_B: 0.36 Rf_A: 0.81

Fp.: 112-115° C

$C_{14}H_{26}N_2O_5$ (302.37)

N-tert.-Butyloxcarbonyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (BOC-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2)

7.93 g BOC-β-Ala-Leu-OH werden zusammen mit 3.54 g HOBt in 75 ml DMF gelöst, auf -5°C gekühlt und mit 5.41 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde gibt man 14 g H-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2.HCl und 2.88 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffes und Abziehen des Lösungsmittels wird der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird aus Methylenchlorid/Ether erhalten.

Ausbeute: 18.1 g (88.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.53

Fp.: 114-117° C

$C_{34}H_{55}N_9O_{10}S$ (781.93)

β-Alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydrochlorid (H-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2.HCl)

17.25 g der BOC-Verbindung werden in 100 ml 1.2 N HCl/Essigsäure 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Lösung wird unter Rühren in 500 ml eiskalten Ether getropft. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 14.5 g (91.5 % d. Th.)

Rf_D: 0.16

Fp.: 96-98° C

$C_{29}H_{48}N_9O_8SCl$ (718.28)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-Obenzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2)

12.07 g BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH werden mit 2.97 g HOBt in 70 ml DMF gelöst, auf -5° C gekühlt und mit 4.54 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde gibt man 15.78 g H-β-

Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2.HCl und 2.42 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach üblicher Aufarbeitung wird aus Methylenchlorid/Ether kristallisiert.

Ausbeute: 9.27 g (34.7 % d. Th.)

Rf_D: 0.55

Fp.: 125-128° C

$C_{60}H_{81}N_{11}O_{14}S$ (1212.44)

O-Benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydrochlorid (H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2.HCl)

9.0 g der oben dargestellten BOC-Verbindung werden in 75 ml 1.2 N HCl/Essigsäure eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und nach beendeter BOC-Abspaltung in 300 ml eiskalten Ether gegossen. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit Ether gewaschen und über Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisation aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 7.9 g (92.7 % d. Th.)

Rf_D: 0.46

Fp.: 148-151° C

$C_{55}H_{74}N_{11}O_{12}SCl$ (1148.78)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (BOC-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2)

1.98 g BOC-Trp-OH und 0.88 g HOBt werden in 50 ml DMF gelöst und nach Kühlen auf -5° C mit 1.34 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde gibt man 7.5 g H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2.HCl und 0.72 g N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur. Die Aufarbeitung erfolgt analog den vorhergegangenen Kupplungen. Kristallisation aus Methylenchlorid/DMF/Ether.

Ausbeute: 7.05 g (77.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.44

Fp.: 155-157° C

$C_{71}H_{91}N_{13}O_{15}S$ (1398.65)

L-Tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydrochlorid (H-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2.HCl)

6 g der zuvor dargestellten BOC-Verbindung werden mit 75 ml 1.2 N HCl/Essigsäure und 1 ml Ethandithiol versetzt und unter Stickstoffatmosphäre eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die so erhaltene Lösung wird unter

Rühren in 500 ml eiskalten Ether eingetropft. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit kaltem Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Das Produkt wird aus Methanol/Ether umkristallisiert.

Ausbeute: 5.21 g (91.0 % d. Th.)

Rf_D: 0.43

Fp.: 137-140° C

$C_{66}H_{84}N_{13}O_{13}SCl$ (1334.99)

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-O-benzyl-Lseryl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (Z-Pyr-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2)

880 mg Z-Pyr-His-OH werden zusammen mit 297 mg HOBt in 50 ml DMF gelöst und auf 0° gekühlt. Nach Versetzen mit 413 mg DCCI gibt man 2.66 g des entacylierten Octapeptids hinzu, gefolgt von 0.22 ml N-Methylmorpholin. Man rührt den Ansatz zwei Stunden bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffes wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in einem Gemisch von Essigester/n-Butanol (5:1) aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Das Produkt erhält man aus Methylenchlorid/DMF/Ether.

Ausbeute: 2.5 g (74.4 % d. Th.)

Rf_D: 0.41

Fp.: 162-165° C

$C_{85}H_{102}N_{17}O_{18}S$ (1681.92)

L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydroacetat (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-β-Ala-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2.HAc)

1.5 g Z-Pyr-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2 werden analog den vorhergegangenen Abspaltungen der Schutzgruppen mit flüssigem Fluorwasserstoff in Gegenwart von Anisol und Ethandithiol vorgenommen und entsprechend verteilungschromatographisch und ionenaustauschchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 0.5 g (46.7 % d. Th.)

Rf: 0.44 (n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser: 15:10:3:12)

Fp.: > 220° C

Aminosäureanalyse:	Glu	His	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg
	1.1	1.0	0.85	1.0	1.0	1.0	1.0
	Pro	β-Ala					
	0.97	1.0					

$C_{56}H_{77}N_{17}O_{13}.CH_3COOH$ (1256.39)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alaninmethylester (BOC-Tyr(Bzl)-β-Ala-OMe)

11.14 g BOC-Tyr(Bzl)-OH werden zusammen mit 3.3 ml N-

Methylmorpholin in 100 ml DMF gelöst, auf -5° C gekühlt und mit 8.25 g DPPA versetzt. Nach 15 min. gibt man 4.19 g H-β-AlaOMe.HCl und nochmals 3.3 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie üblich gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat erhält man das Produkt auf Zugabe von Petrolether in fester Form.

Ausbeute: 10 g (73 % d. Th.)

Rf_D: 0.38

Fp.: 112-115° C

$C_{25}H_{32}N_2O_6$ (456.54)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanin (BOC-Tyr(Bzl)-β-Ala-OH)

8.5 g BOC-Tyr(Bzl)-β-Ala-OMe werden in 100 ml Dioxan/Wasser (4:1) gelöst und mit 11 ml 2 N Natronlauge verseift. Nach üblicher Aufarbeitung erhält man aus Essigester/Petrolether das gewünschte Produkt in kristalliner Form.

Ausbeute: 7.5 g (91 % d. Th.)

Rf_D: 0.58

Fp.: 172° C

$C_{24}H_{30}N_2O_6$ (442.51)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucinmethylester (BOC-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-OMe)

4.84 g BOC-Tyr(Bzl)-β-Ala-OH und 2.12 ml Triethylamin werden zusammen in 50 ml DMF gelöst und nach Kühlen auf -5° C mit 4.16 g DPPA versetzt. Nach 15 min. werden 2.72 g H-Leu-OMe.HCl und 2.12 ml Triethylamin hinzugegeben. Man rührt weitere zwei Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur, dann wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Kristallisation wird durch Zugabe von Petrolether erreicht.

Ausbeute: 5.5 g (88.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.62

Fp.: 151° C

$C_{31}H_{43}N_3O_7$ (569.70)

Der gleiche Ansatz mit DCCI/HOBt gekuppelt, ergibt 5.11 g (82.02 % d. Th.)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucin (BOC-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-OH)

4.5 g BOC-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-OMe werden in 100 ml Dioxan/Wasser (4:1) mit 10 ml 1 N Natronlauge verseift. Umkristallisation erfolgt aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 3.9 g (89.0 % d. Th.)

Rf_D: 0.38

Fp.: 92-94° C

$C_{30}H_{41}N_3O_7$ (555.67)

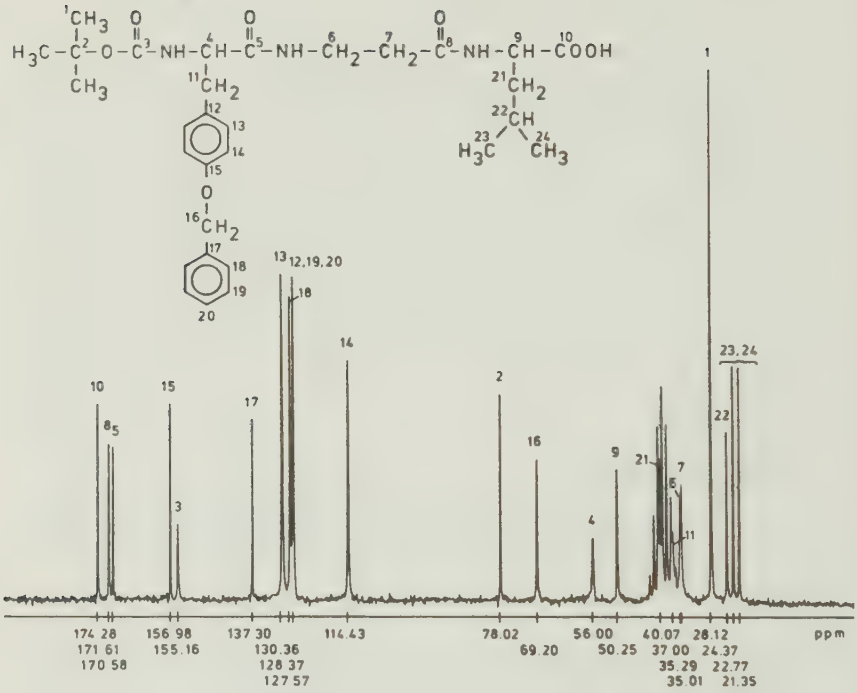


Abb. 86: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-OH, 220 mg in 1ml DMSO-d_6, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 10 000 Pulsinterferogramme

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid (BOC-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2)

2.78g BOC-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-OH werden zusammen mit 0.68 g HOBt in 35 ml DMF gelöst und auf -5° C gekühlt. Nach Zugabe von 1.03 g DCCI rührt man eine Stunde bei 0° C und gibt dann 2.74 g H-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl als Aminokomponente sowie 0.55 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt den Ansatz weitere zwei Stunden bei 0° und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffes wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und sukzessive mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung, 1 N Citronensäure und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat erhält man das Produkt aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 3.1 g (59.0 % d.Th.)

Rf_D: 0.6

Fp: 141-145° C

$C_{51}H_{72}N_{10}O_{12}S$ (1049.26)

O-Benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid-hydrochlorid (H-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl)

2.5 g der BOC-Verbindung werden mit 50 ml 1.2 N HCl/Essigsäure versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.

Die so erhaltene Lösung wird unter Rühren in eiskalten Ether gegossen, der gebildete Niederschlag nach Absaugen und Waschen mit Ether getrocknet und aus Methanol/Ether umkristallisiert.

Ausbeute: 2.1 g (89.3 % d.Th.)

Rf_D: 0.45

Fp.: 125-128°C

$C_{46}H_{65}N_{10}O_{10}SCl$ (985.60)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-serin-methylester (BOC-Trp-Ser(Bzl)-OMe)

4.42 g BOC-Trp-OH werden zusammen mit 1.96 g HOBt in 50 ml DMF gelöst und auf -5° C gekühlt. Nach Zugabe von 2.99 g DCCI rührt man eine Stunde bei 0° und gibt dann 3.57 g H-Ser(Bzl)-OMe.HCl und 1.6 ml N-Methylmorpholin hinzu. Nach weiteren zwei Stunden bei 0° wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Die Aufarbeitung des nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum verbliebenen Rückstandes erfolgt wie üblich. Umkristallisation erfolgt aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 5.9 g (71.5 % d.Th.)

Rf_D: 0.71

$\{\alpha\}_D^{20}$: -1.8 (c=1, MeOH)

Fp.: 110° C

$C_{27}H_{33}N_3O_6$ (567.64)

L-Tryptophyl-O-benzyl-L-serinmethylester-hydrochlorid
(H-Trp-Ser(Bzl)-OMe.HCl)

5 g der oben synthetisierten BOC-Verbindung werden mit 40 ml 1.2 N HCl/Essigsäure unter Stickstoffatmosphäre in Gegenwart von 1 ml Anisol bei Raumtemperatur eine Stunde gerührt und anschließend in 500 ml eiskalten Ether gegossen. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit kaltem Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisation aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 2.75 g (72.34 % d.Th.)

Rf_D: 0.66

Fp.: 145-147° C

$C_{22}H_{26}N_3O_4Cl$ (431.92)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-N^{im}-(1-benzyloxycarbonylamino-2.2.2-trifluorethyl)-L-histidyl-L-tryptophyl-O-benzyl-serin-methylester (BOC-His(ZTE)-Trp-Ser(Bzl)-OMe)

3.65 g BOC-His(ZTE)-OH werden zusammen mit 0.68 g HOBt in 100 ml Methylenchlorid gelöst und nachdem auf -5° C gekühlt wurde mit 1.55 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde gibt man 3.24 g H-Trp-Ser(Bzl)-OMe.HCl und 0.82 ml N-Methylmorpholin hinzu rührt weitere zwei Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur. Der ausgefallene Harnstoff wird abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Das Produkt wird aus Methylenchlorid/

Ether/Petrolether erhalten.

Ausbeute: 5.52 g (85.1 % d. Th.)

Rf_D: 0.55

Fp.: 98-100° C

$C_{43}H_{48}N_7O_9F_3$ (863.89)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-N^{im}-(1-benzyloxycarbonylamino-2.2.2-trifluorethyl)-L-histidyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-serin (BOC-His(ZTE)-Trp-Ser(Bzl)-OH)

4.5 g BOC-His(ZTE)-Trp-Ser(Bzl)-OMe werden in 100 ml Dioxan/Wasser (4:1) gelöst und unter Rühren mit 10 ml 1 N Natronlauge verseift. Nach beendeter Verseifung wird unter Kühlung mit 1 N Salzsäure neutralisiert. Die erhaltene Lösung wird im Vakuum vom Dioxan befreit, der Rückstand mit Essigester überschichtet und mit Citronensäure auf pH 3 angesäuert. Die wässrige Phase wird noch zweimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Petrolether.

Ausbeute: 4.0 g (90.4 % d.Th.)

Rf_D: 0.40

Fp.: 113° C (Z.)

$C_{42}H_{46}N_7O_9F_3$ (849.86)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-N^{im}-(1-benzyloxycarbonylamino-2.2.2-trifluorethyl)-L-histidyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alanin-amid (BOC-His(ZTE)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2)

1.27 g BOC-His(ZTE)-Trp-Ser(Bzl)-OH werden zusammen mit 0.21 g HOBt in 30 ml DMF gelöst auf -5° C gekühlt und mit 0.31 g DCCI versetzt. Man rührt eine Stunde bei 0° und gibt dann 1.39 g H-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl und 0.17 ml N-Methylmorpholin hinzu. Der Ansatz wird wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 1.9 g (71.4 % d. Th.)

Rf_D: 0.46

Fp.: 146-148° C

$C_{88}H_{108}N_{17}O_{18}SF_3$ (1781.99)

N^{im}-(1-Benzyloxycarbonylamino-2.2.2-trifluorethyl)-L-histidyl-L-tryprtophyl-O-benzyl-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid-hydrochlorid (H-His(ZTE)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl)

1.5 g der zuvor dargestellten BOC-Verbindung werden in 10 ml Essigsäure suspendiert und unter Stickstoffatmosphäre unter Zusatz von 1 ml Anisol mit 25 ml 1.2 N HCl/Essigsäure ver-

setzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach üblicher Aufarbeitung wird aus Methanol/Ether Kristallisiert.

Ausbeute: 1 g (68.9 % d. Th.)

Rf_D:0.40

Fp.: 165-168° C

$C_{83}H_{101}N_{17}O_{16}SF_3Cl$ (1717.34)

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-N^{im}-(1-benzyloxycarbonyl-amino-2.2.2-trifluorethyl)-L-histidyl-L-tryptophyl-O-benzyl-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxy-benzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid (Z-Pyr-His(ZTE)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2)

0.18 g Z-Pyr-OSu und 0.86 g des entacylierten Nonapeptidamids werden in 30 ml DMF gelöst und mit 0.6 ml N-Methylmorpholin und einer Spatelspitze HOBt als Katalysator versetzt und 36 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wird in Essigester/n-Butanol (5:1) aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird aus DMF/Ether kristallisiert.

Ausbeute: 0.58 g (60.4 % d. Th.)

Rf_D: 0.43

Fp.: 164-165° C

$C_{96}H_{111}N_{18}O_{20}SF_3$ (1926.11)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxy-benzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid (BOC-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2)

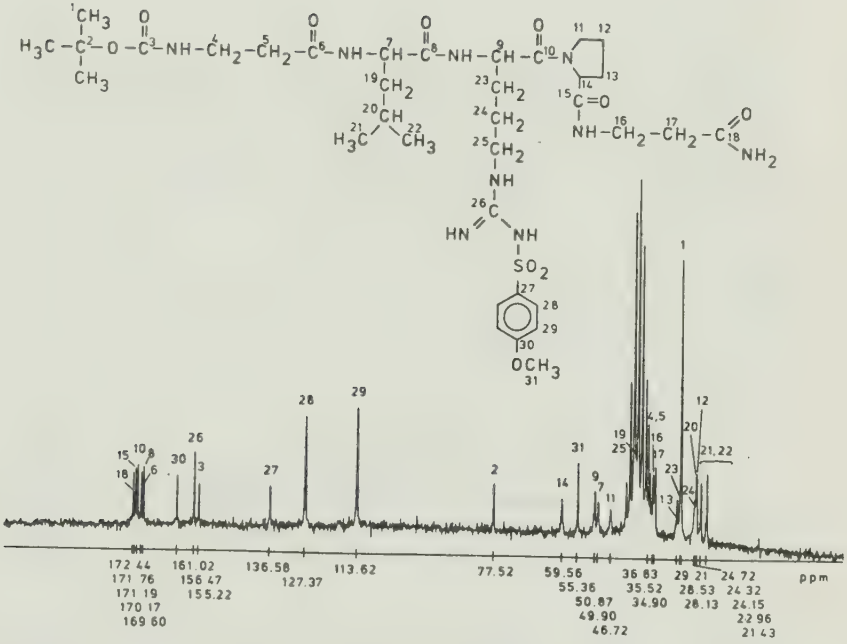


Abb. 87: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2, 70 mg in 1 ml DMSO-d_6, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 62 900 Pulsinterferogramme

6.34 g BOC-β-Ala-Leu-OH werden zusammen mit 3.21 g HOBt in 100 ml DMF gelöst und nach Kühlung auf -5° C mit 4.32 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde gibt man 11.51 g H-Arg (Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl und 2.3 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Dicyclohexyharnstoffes wird wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Ether.

Ausbeute: 9.27 g (55.5 % d. Th.)

Rf_A: 0.51

Fp.: 123-125° C

$C_{35}H_{57}N_9O_{10}S$ (795.96)

β-Alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid-hydrochlorid (H-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl)

8.23 g des zuvor dargestellten BOC-Pentapeptidamids werden mit 100 ml 1.2 N HCl/Essigsäure bis zur vollständigen Entfernung der BOC-Schutzgruppe bei Raumtemperatur gerührt. Die klare Lösung wird unter Rühren in 500 ml eiskalten Ether gegossen, der Niederschlag wird abgesaugt, mit kaltem Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisiert wird aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 6.92 g (91.4 % d. Th.)

Rf_D: 0.13

Fp.: 99-102° C

$C_{30}H_{50}N_9O_8SCl$ (732.30)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid (BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2)

5.49 g BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH werden mit 1.53 g HOBt in 75 ml DMF gelöst und nach Kühlung auf -5° C mit 2.06 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde bei dieser Temperatur gibt man 7.33 g H-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl sowie 1.1 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur. Die Aufarbeitung des Ansatzes erfolgt nach Abfiltrieren des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffes wie üblich. Kristallin erhält man die Substanz aus Methylenchlorid/Ether.

Ausbeute: 5.1 g (41.6 % d. Th.)

Rf_D: 0.49

Fp.: 120-122° C

$C_{61}H_{83}N_{11}O_{14}S$ (1226.46)

O-Benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid-hydrochlorid (H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl)

4.52 g BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2 werden mit 1 ml Anisol versetzt und dann mit 75 ml 1.2 N HCl/Essigsäure übergossen und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die so erhaltene Lösung wird unter

Rühren in 250 ml eiskalten Ether getropft, der gebildete Niederschlag abgesaugt, mit kaltem Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 3.77 g (88.0 % d. Th.)

Rf_D: 0.42

Fp.: 157-158° C

$C_{56}H_{76}N_{11}O_{12}SCl$ (1162.81)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid (BOC-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2)

0.73 g BOC-Trp-OCP und 1.75 g H-SerBzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl werden in 50 ml DMF gelöst und mit 0.17 ml N-Methylmorpholin sowie einer Spatelspitze HOBt als Katalysator versetzt und 36 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum und Aufnehmen des Rückstandes in Essigester wird wie üblich gewaschen und getrocknet. Die feste Substanz wird aus Methlenchlorid/Ether/Petrolether erhalten.

Ausbeute: 1.43 g (67.1 % d. Th.)

Rf_D: 0.48

Fp.: 138-139° C (Z.)

$C_{72}H_{93}N_{13}O_{15}S$ (1412.68)

L-Tryptophyl-O-benzyl-seryl-O-benzyl-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid-hydrochlorid (H-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl)

4.07 g des oben dargestellten BOC-Octapeptidamids werden nach Zusatz von 0.5 ml Ethandithiol und 0.5 ml Anisol mit 75 ml 1.2 N HCl/Essigsäure unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur eine Stunde lang gerührt. Der Ansatz wird dann mit 500 ml absolutem Ether versetzt, der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit Ether gewaschen und getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 3.65 g (93.9 % d. Th.)

Rf_D: 0.44

Fp.: 164° C (Z.)

$C_{67}H_{86}N_{13}O_{13}SCl$ (1349.02)

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid (Z-Pyr-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2)

0.8 g Z-Pyr-His-OH werden zusammen mit 0.27 g HOBt in 40 ml DMF gelöst und nach Kühlen auf -5° C mit 0.41 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde bei dieser Temperatur gibt man 2.7 g der Aminokomponente und 0.22 ml N-Methyl-

morpholin hinzu und rührt weitere zwei Stunden bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester, dem etwas n-Butanol hinzugefügt wird, aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/DMF/Ether.

Ausbeute: 3.1 g (81.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.43

Fp.: 164-165° C

$C_{86}H_{103}N_{17}O_{18}S$ (1694.94)

L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-β-Ala-Leu-Arg-Pro-β-Ala-NH_2)

0.4 g des nach dem ersten Syntheseweg gewonnenen geschützten Decapeptidamids bzw. 1 g des nach dem zweiten Weg dargestellten Decapeptidamids werden unter Zusatz von Anisol und Ethandithiol in einer Sakakibara-Apparatur mit flüssigem Fluorwasserstoff, der über Kobalttrifluorid getrocknet wurde, eine Stunde bei 0° C gerührt. Nach Entfernen des Fluorwasserstoffs im Stickstoffstrom wird der Rückstand in 0.1 N Essigsäure aufgenommen und zur Entfernung des Anisols bzw. Ethandithiols dreimal mit Ether ausgeschüttelt. Die wässerige Phase wird mit DOWEX 1X4-Anionenaustauscher (Acetatform) behandelt

und anschließend lyophilisiert. Das so gewonnene Rohprodukt wird durch Verteilungschromatographie an Sephadex G 25 bzw. Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose analog wie bei den zuvor beschriebenen Decapeptidamiden gereinigt.

Ausbeuten: 0.15 g (60 % d. Th.) bzw. 0.48 g (67.2 % d. Th.)

Rf: 0.44 (n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser: 15:10:3:12)

Fp.: 175-177° C (Z.)

$C_{57}H_{79}N_{17}O_{13}$ (1210.37)

S-2-Diazoacetyl-1-pyrrolidincarbonsäure-benzylester (Z-Pro-diazoketon)

Diese Verbindung wird nach Literatur 126 synthetisiert. 22.41 g Z-Pro-OH werden in 50 ml absolutem Methylenchlorid gelöst und auf -5° C gekühlt. Nach Zusatz von 5 Tropfen DMF, tropft man unter Rühren 11.25 ml Oxalylchlorid hinzu. Der Reaktionsansatz wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt; der verbliebene Rückstand wird zur vollständigen Entfernung von HCl im Ölpumpenvakuum getrocknet. Man erhält Z-Pro-Cl als gelbes Öl, das in 50 ml absolutem Ether gelöst wird und so zu einer Lösung von 8 g Diazomethan, das aus Nitrosomethylharnstoff gewonnen wurde, in 600 ml Ether zugetropft wird, daß die Temperatur 5° C nicht überstiegen wird. Man rührt noch eine Stunde bei 0° und vernichtet dann den Überschuß Diazomethan mit einigen Tropfen Essigsäure.

Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wird aus wenig Ether umkristallisiert.

Ausbeute: 16.2 g (65 % d. Th.)

Rf_D: 0.65

Fp.: 63° C Lit: 64-65° C[126]

$[\alpha]_D^{20}$: +145.7 (c=1, $CHCl_3$) Lit: +147.7 (c=1, $CHCl_3$)

$C_{14}H_{15}N_3O_3$ (273.29)

(S)-1-Benzyloxycarbonyl-2-pyrrolidinessigsäuremethylester[124]
(Z-h-Pro-OMe)

37.5 g Z-Pro-diazoketon werden in 170 ml absolutem Methanol gelöst und mit 1.9 ml einer Lösung von Silberbenzoat in Triethylamin (1.43 g Silberbenzoat in 13 ml Triethylamin) versetzt. Nach einem Temperaturanstieg auf 40° C (nach ∿ 15 min.) wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit einem Gramm Aktivkohle versetzt. Der Ansatz wird nach 15 min Rückflußkochen über Cellite abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, und der Rückstand in 750 ml Ether aufgenommen. Nach mehrmaligem Waschen mit Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser trocknet man über Natriumsulfat. Nach Entfernen des Ethers verbleibt die Substanz als Öl.

Ausbeute: 34.5 g (90.7 % d. Th.)

Rf_D: 0.87

$[\alpha]_D^{20}$: -34.6 (c=1.02, $CHCl_3$) Lit: -35.2 (c=1, $CHCl_3$)

$C_{15}H_{19}NO_4$ (277.32)

(S)-1-Benzyloxycarbonyl-2-pyrrolidinessigsäure (Z-h-Pro-OH)

Die Verseifung des zuvor gewonnenen Methylesters wird nach Literatur 124 vorgenommen.
34 g Z-h-Pro-OMe werden in 75 ml Methanol gelöst und mit 66 ml 4 N Natronlauge tropfenweise unter Rühren bei Raumtemperatur verseift. Die Reaktion ist etwa nach zwei Stunden beendet. Man neutralisiert den Ansatz unter Kühlung mit 4 N Salzsäure und bringt dann im Vakuum zur Trockene. Der Rückstand wird zwischen Essigester und Wasser verteilt und mit 1 N Salzsäure auf pH 2 gebracht. Nach Abtrennen der Essigesterphase wird die wäßrige Phase noch zweimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit NaCl-Lösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels erhält man die Substanz als gelbliches Öl, das aus wenig Diisopropylether kristallisiert.
Ausbeute: 27.5 g (85.2 % d. Th.)
Rf_A: 0.66
Fp.: 73-75° C Lit: 74-75° C
$\{\alpha\}_D^{20}$: -34.6 (c=1, HAc) Lit: -35.7 (c=1, HAc)
$C_{14}H_{17}NO_4$ (263.29)

N-Benzyloxycarbonyl-h-prolyl-glycinmethylester (Z-h-Pro-Gly-OMe)

6.8 g Z-h-Pro-OH werden zusammen mit 3.48 g HOBt in 50 ml DMF und nach Kühlen auf -5° C mit 5.33 g DCCI versetzt.

Nach einer Stunde bei 0^{o} gibt man 3.24 g H-Gly-OMe.HCl und 2.84 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0^{o} und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffes wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und nach Aufnehmen des Rückstandes in Essigester wird wie üblich gewaschen und getrocknet. Nach Entfernen des Essigesters verbleibt die Substanz als Öl.

Ausbeute: 6.65 g (77 % d. Th.)

Rf_D: 0.57 Rf_A: 0.68

$C_{17}H_{22}N_2O_5$ (334.37)

Homo-prolyl-glycinmethylester-hydrochlorid (H-h-Pro-Gly-OMe.HCl)

17 g Z-h-Pro-Gly-OMe werden in 100 ml Methanol gelöst, mit 2 g Palladium/Aktivkohle-Katalysator versetzt und nach Verdrängen des Luftsauerstoffs mit Stickstoff, im Wasserstoffstrom hydriert; dabei wird mit 0.1 N Salzsäure unter Zuhilfenahme eines pH-Staten ein pH-Wert von 4.5 aufrechterhalten. Nach beendeter Reaktion wird vom Katalysator abfiltriert, die Lösung im Vakuum eingeengt und schließlich im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die Substanz, die als Öl erhalten wird, wird ohne weitere Charakterisierung direkt weiterverarbeitet.

Ausbeute: 11.1 g (92.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.29

$C_9H_{17}N_2O_3Cl$ (236.7)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-homo-prolyl-glycinmethylester (Z-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-OMe)

16.94 g Z-Arg(Mbs)-OH werden zusammen mit 4.78 g HOBt in 100 ml DMF gelöst und nach Kühlung auf -5° C mit 7.3 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde bei 0° gibt man 9.21 g H-h-Pro-Gly-OMe.HCl und 4.27 ml N-Methylmorpholin hinzu. Nach zwei Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur wird wie üblich aufgearbeitet. Umkristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Ether.

Ausbeute: 15.9 g (67.9 % d. Th.)

Rf_D: 0.87

Fp.: 110° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: -13 (c=1, MeOH)

$C_{30}H_{40}N_6O_9S$ (660.75)

Der gleiche Ansatz nach der DPPA-Methode gekuppelt, ergibt lediglich 7.09 g (30.3 % d. Th.)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-homo-prolyl-glycinamid (Z-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2)

8.06 g Z-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-OMe werden in 200 ml Methanol gelöst und bei -5° C mit gasförmigem Ammoniak gesättigt. Nach zweitägigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Um letzte Spuren von Ammoniak zu entfernen wird der Rückstand mehrmals in Methanol aufgenommen und wieder vom Lösungsmittel befreit.

Der Rückstand wird aus Methanol/Ether kristallin erhalten.

Ausbeute: 7.3 g (92.6 % d. Th.)

Rf_D: 0.82

Fp.: 87-88° C

$C_{29}H_{39}N_7O_8S$ (645.74)

N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-homo-prolyl-glycinamid-hydrochlorid (H-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2.HCl)

7 g Z-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2 werden in 150 ml Methanol gelöst mit 1 g Palladium/Aktivkohle-Katalysator versetzt und mit Wasserstoff im Durchfluß hydriert, wobei mit 1 N Salzsäure unter Zuhilfenahme eines pH-Staten, ein pH-Wert von 4.5 aufrechterhalten wird. Nach beendeter Reaktion wird der Katalysator über Cellite abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Methanol/Ether umkristallisiert.

Ausbeute: 5.33 g (89.7 % d. Th.)

Rf_D: 0.05

Fp.: 66-68° C

$C_{21}H_{34}N_7O_6SCl$ (548.06)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-homo-prolyl-glycinamid (BOC-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2)

6.92 g BOC-Gly-Leu-OH werden zusammen mit 3.24 g HOBt in 75 ml DMF gelöst und auf -5° C gekühlt. Nach Zugabe von

4.94 g DCCI rührt man den Ansatz eine Stunde bei 0^{o} und gibt dann 13.15 g H-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2.HCl und 2.63 ml N-Methylmorpholin hinzu. Der Ansatz wird analog den vorhergegangenen Kupplungen aufgearbeitet, nachdem über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 16.58 g (91.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.66

Fp.: 115-118° C

$C_{34}H_{55}N_9O_{10}S$ (781.93)

Glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-homo-prolyl-glycinamid-hydrochlorid (H-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2.HCl)

16.2 g des oben dargestellten BOC-Pentapeptidamids werden mit 100 ml 1.2 N HCl/Essigsäure übergossen und 1.5 h bis zur vollständigen Entfernung der BOC-Schutzgruppe bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Lösung wird unter Rühren in 500 ml eiskalten Ether getropft, der Rückstand abgesaugt, mit Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 13.25 g (89.0 % d. Th.)

Rf_A: 0.38

Fp.: 152-153° C

$C_{29}H_{48}N_9O_8SCl$ (718.28)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-homo-prolyl-glycinamid (BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2)

13.73 g BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH werden zusammen mit 3.38 g HOBt in 100 ml DMF gelöst und auf -5° C gekühlt. Nach Zugabe von 5.15 g DCCI rührt man eine Stunde bei 0° und gibt dann 17.96 g H-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2.HCl und 2.75 ml N-Methylmorpholin hinzu. Der Ansatz verbleibt weitere zwei Stunden in der Kälte und wird dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffes wird wie üblich gewaschen und getrocknet. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/DMF/Ether.

Ausbeute: 12.8 g (42.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.56 Rf_A: 0.65

Fp.: 127-129° C

$C_{60}H_{81}N_{11}O_{14}S$ (1212.44)

O-Benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-homo-prolyl-glycinamid-hydrochlorid (H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2.HCl)

11 g der zuvor dargestellten BOC-geschützten Verbindung werden in 100 ml 1.2 N HCl/Essigsäure so lange gerührt, bis die BOC-Schutzgruppe quantitativ entfernt ist (∿1 h),

dann wird die Lösung unter Rühren in 500 ml eiskalten Ether gegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Ether gewaschen und über festem Kaliumhydoxid getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 10.07 g (96.6 % d. Th.)

Rf_D: 0.54 Rf_A: 0.45

Fp.: 143-146° C

$C_{55}H_{74}N_{11}O_{12}SCl$ (1148.78)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-homo-prolyl-glycinamid (BOC-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2)

2.42 g BOC-Trp-OCP und 5.74 g H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2.HCl werden in 50 ml DMF gelöst und mit 0.55 ml N-Methylmorpholin sowie einer Spatelspitze HOBt als Katalysator versetzt und 36 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde, wird in Essigester, dem etwas n-Butanol hinzugefügt wird, aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Ether.

Ausbeute: 6.08 g (86.9 % d. Th.)

Rf_A: 0.66

Fp.: 145-148° C

$C_{71}H_{91}N_{13}O_{15}S$ (1398.65)

L-Tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-homo-prolyl-glycinamid-hydrochlorid (H-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2.HCl)

5.43 g BOC-Octapeptidamid werden unter Zusatz von 0.5 ml Ethandithiol und 0.5 ml Anisol mit 60 ml 1.2 N HCl/Essigsäure unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur eine Stunde gerührt. Nach Ausfällen der Verbindung mit Ether, wird abgesaugt,mit Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 4.9 g (94.6 % d. Th.)

Rf_A: 0.6

Fp.: 156-157° C

$C_{66}H_{84}N_{13}O_{13}SCl$ (1334.99)

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-homo-prolyl-glycinamid (Z-Pyr-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2)

0.7 g Z-Pyr-His-OH werden zusammen mit 0.38 g HOBt in 30 ml DMF gelöst und auf -5° C gekühlt, dann gibt man 0.36 g DCCI hinzu, nach einer Stunde bei dieser Temperatur erfolgt die Zugabe von 2 g des zuvor synthetisierten Octapeptidamid-hydrochlorids, sowie 0.17 ml N-Methylmorpholin.

Nach zwei Stunden bei 0^{o} wird der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester/n-Butanol (4:1) aufgenommen und nach der üblichen Waschprozedur über Magnesiumsulfat getrocknet. Kristallisation erfolgt aus DMF/Ether.

Ausbeute: 2 g (79.3 % d. Th.)

Rf_{D}: 0.40

Fp.: 153-155° C

$C_{85}H_{101}N_{17}O_{18}S$ (1680.81)

L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-L-arginyl-homo-prolyl-glycinamid-hydroacetat (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-h-Pro-Gly-NH_2.HAc)

1 g des geschützten Decapeptidamids werden in einer Teflonapparatur mit 0.25 g Anisol und 0.25 g Ethandithiol versetzt und anschließend mit 15 ml flüssigem, über Kobalttrifluorid getrocknetem, Fluorwasserstoff eine Stunde bei 0^{o} C gerührt; dann wird der Fluorwasserstoff mit Stickstoff verdrängt, der Rückstand über festem Kaliumhydroxid getrocknet und anschließend in 100 ml 0.1 N Essigsäure aufgenommen. Zur Entfernung des Anisols bzw. Ethandithiols wird die wäßrige Lösung dreimal mit Ether ausgeschüttelt und dann mit Anionenaustauscher DOWEX 1X4 (Acetatform) behandelt. Die so erhaltene Lösung wird nach Abfiltrieren des Austauschers gefriergetrocknet. Das Produkt

wird wie bei den zuvor beschriebenen Decapeptidamiden durch Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: 0.2 g (26.7 % d. Th.)

Rf: 0.42 (n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser: 15:10:3:12)

Fp.: 195-197° C (Z.)

Aminosäureanalyse:	Glu	His	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg
	1.02	1.0	0.86	1.01	2.01	1.0	1.02

$C_{56}H_{77}N_{17}O_{13}.CH_3COOH$ (1256.39)

(S)-(-)-α-Phenylethyl-succinimid

Die Verbindung wird nach Literatur 135 synthetisiert. 20.01 g Succinimid werden mit 24.23 g (S)-α-Phenylethylamin bei 180° C sechs Stunden am Rückfluß gekocht. Kristallisation aus Ethanol/Ether.

Ausbeute: 38 g (93.5 % d. Th.)

Fp.: 66-68° C Lit: 68.5° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: -67.5 (c=1, EtOH) Lit: -69.8 (c=1, EtOH)

$C_{12}H_{13}NO_2$ (203.24)

N-(α-Phenylethyl)-5-hydoxy-2-pyrrolidinon

Die Verbindung wird nach Literatur 136 synthetisiert. 37 g des zuvor synthetisierten Succinimids werden in 2 l Ethanol bei -25° C mit 48.2 g Natriumborhydrid reduziert, wobei alle 15 min je zwei Tropfen 2 N Salzsäure zum Reaktionsansatz gegeben werden. Reaktionsdauer 5 1/2 h. Nach

beendeter Reaktion wird die so erhaltene Lösung in Wasser gegossen und dann mit Chloroform extrahiert. Nach Waschen der vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung, trocknet man über Natriumsulfat. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man die Substanz als Öl, das wegen seiner Instabilität sofort weiterverarbeitet wird.

Ausbeute: 18.68 g (50 % d. Th.)

$C_{12}H_{15}NO_2$ (205.26)

N-(α-Phenylethyl)-pyrrolidinon-2-essigsäuremethylester-(5)

Die Verbindung wird nach Literatur 135 synthetisiert. 5.54 g Natriumhydridsuspension (80 %ig) werden unter Stickstoff in 50 ml absolutem Dimethoxyethan suspendiert. Nach Kühlen des Ansatzes auf -20° C, tropft man unter Rühren 33.9 ml ≙ 38.81 g Methyldiethylphosphonoacetat in 50 ml Dimethoxethan hinzu und rührt weitere 20 min bei dieser Temperatur. Nach Kühlung auf -35° C folgt die tropfenweise Zugabe von 37.9 g der oben synthetisierten Hydroxyverbindung in 45 ml Dimethoxyethan. Man rührt den Ansatz weitere drei Stunden bei -35° C und läßt anschließend auf Raumtemperatur kommen. Das Lösungsmittel wird bei 20° C im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels erhält man die Substanz als Öl.

Ausbeute: 39 g (80.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.54

$C_{15}H_{19}NO_3$ (261.32)

N-(α-phenylethyl)-pyrrolidinon-2-essigsäure-(5)

Die Verbindung wurd nach Vorschrift 135 synthetisiert. 38.5 g des N-substituierten Pyrrolidinonessigsäuremethylesters werden in 150 ml Methanol gelöst und tropfenweise mit 50 ml 4 N Kaliumhydroxidlösung verseift. Nach beendeter Reaktion wird unter Kühlung mit 4 N Salzsäure neutralisiert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 100 ml Wasser suspendiert, mit Essigester überschichtet und mit 2 N Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Nach Abtrennen der organischen Phase wird die wäßrige Phase noch zweimal mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Substanz wird anschließend zweimal aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 20.1 g (81.3 % d. Th.)

Rf_D: 0.44

Fp.: 202° C Lit: 205-206° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: -159 (c=1, DMF) Lit: -161.7 (c=1, EtOH)

$C_{14}H_{17}NO_3$ (247.29)

(S)-(+)-Pyrrolidinon-2-essigsäure-5 (h-Pyr-OH)

10 g der N-(α-phenylethyl)-pyrrolidinon-2-essigsäure-5 werden für 6 Stunden mit 6 N Salzsäure am Rückfluß gekocht,

das dabei entstehende β-Aminoadipinsäure-hydrochlorid wird anschließend mit Pyridin 1.5 h am Rückfluß gekocht wobei Cyclisierung eintritt. Kristallisation erfolgt aus Ethanol/Ether. Die Substanz erhält man als ihr Pyridinium-Salz.

Ausbeute: 4.3 g (74.4 % d. Th.)

Rf_D: 0.11 Rf_A: 0.52

Fp.: 100° C Fp.: 103-105° C (Lit.)

$\{\alpha\}_D^{20}$: +15.8 (c=1, EtOH) Lit: +17.6 (c=1, EtOH)

$C_6H_9NO_3.C_6H_5N$ (234.25)

Homo-pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (h-Pyr-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2)

143 mg h-Pyr-OH werden zusammen mit 135 mg HOBt in 25 ml DMF gelöst auf -5° C gekühlt und mit 206 mg DCCI versetzt. Nach einer Stunde bei dieser Temperatur gibt man 750 mg H-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2. HCl und 0.11 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur. Die Aufarbeitung des Ansatzes erfolgt wie üblich. Umkristallisation erfolgt aus DMF/Ether.

Ausbeute: 510 mg (65.9 % d. Th.)

Rf_D: 0.33

Fp.: 165-168° C

$C_{77}H_{95}N_{17}O_{16}S$ (1546.77)

Homo-pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydroacetat (h-Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2.HAc)

250 mg des geschützten Decapeptidamids werden wie die vorhergegangenen Peptide mit flüssigem Fluorwasserstoff von den verbliebenen Schutzgruppen befreit. Die Aufarbeitung und Reinigung der Verbindung wird ebenfalls analog den zuvor beschriebenen Decapeptidamiden durchgeführt.

Ausbeute: 50 mg (25.9 % d. Th.)

Rf: 0.45 (n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser: 15:10:3:12)

Fp.: >225° C

Aminosäureanalyse:

h-Pyr	His	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg
1.0	0.81	0.86	0.99	2.02	1.02	1.0

Pro
1.0

$C_{56}H_{77}N_{17}O_{13}\cdot CH_3COOH$ (1256.39)

(S)-(-)-Ekgoninsäure (Ecg-OH) bzw. (N-Methylhomopyroglutaminsäure)

2 g Pyrrolidinon-2-essigsäure-(5) werden in 50 ml DMF gelöst und auf -10° C gekühlt und unter Stickstoff mit 0.94 g Natriumhydridsuspension (80 %ig) versetzt. Nach einer Stunde tropft man 4.36 g Methyljodid in 25 ml DMF hinzu, rührt zwei Stunden bei 0° und läßt anschließend auf Raumtemperatur erwärmen, dann wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und sauer und basisch gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels verbleibt Ekgoninsäuremethylester als Öl, das in 50 ml Methanol aufgenommen und mit 10 ml 2 N NaOH verseift wird. Aufarbeitund erfolgt analog den Verseifungen von Peptidestern. Umkristallisation aus Ethanol/Ether.

Ausbeute: 1.8 g (82.6 % d. Th.)

Fp.: 119° C Lit: 121-122° C[219]

$C_7H_{11}NO_3$ (157.17)

Ekgoninyl-L-histidyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (Ecg-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2)

157 mg Ekgoninsäure werden zusammen mit 135 mg HOBt in 20 ml DMF gelöst auf -5° C gekühlt und mit 206 mg DCCI versetzt, nach einer Stunde gibt man 747 mg Aminokomponente H-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2.HCl und 0.11 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur . Der Ansatz wird wie üblich aufgearbeitet und die Substanz aus DMF nach Zusatz von Ether zur Ausfällung gebracht.

Ausbeute: 490 mg (62.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.42

Fp.: 170-173° C (Z.)

$C_{78}H_{97}N_{17}O_{16}S$ (1560.80)

Ekgoninyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydroacetat (Ecg-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2.HAc)

250 mg des geschützten Decapeptidamids werden wie üblich mit Fluorwasserstoff bei 0° C eine Stunde gerührt. Nach Vertreiben des Fluorwasserstoffs mit Stickstoff wird der über Kaliumhydroxid getrocknete Rückstand in 0.1 N Essig-

säure aufgenommen und mit Ether dreimal ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wird mit DOWEX 1X4 - Anionenaustauscher (Acetatform) behandelt und nach Abfiltrieren deselben gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohpeptids erfolgt analog der vorhergegangenen Peptiden.

Ausbeute: 60 mg (30.9 % d. Th.)

Rf: 0.54 (n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser: 15:10:3:12)

Fp.: 192-195° C

Aminosäureanalyse:	His	Ser	Tyr	Gly	Leu	Pro	Arg
	1.0	0.85	1.0	1.92	1.03	1.02	1.03

$C_{57}H_{79}N_{17}O_{13}.CH_3COOH$ (1270.42)

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-D-phenylalanin (Z-Pyr-D-Phe-OH)

5.485 g Z-Pyr-OSu werden mit 3 g D-Phe-Natriumsalz in 50 ml DMF bei Raumtemperatur 48 h gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird in 100 ml Wasser suspendiert, mit Essigester überschichtet und unter Kühlung mit 1 N Salzsäure auf pH 3 angesäuert. Die organische Phase wird abgetrennt, die wäßrige Phase noch zweimal mit Essigester extrahiert, die vereinigten Essigesterphasen mit NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Kristallisation erfolgt aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 3.2 g (51.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.40

Fp.: 113° C

$C_{22}H_{22}N_2O_6$ (410.43)

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-D-phenylalanyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid (Z-Pyr-D-Phe-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2)

205 mg Z-Pyr-D-Phe-OH werden zusammen mit 135 mg HOBt in 25 ml DMF gelöst und nach Kühlung auf -5° C mit 206 mg DCCI versetzt. Nach einer Stunde bei 0° gibt man 617 mg Octapeptidamid.HCl und 0.o5 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffes bringt man im Vakuum zur Trockene und nimmt den Rückstand in Essigester/n-Butanol (4:1) auf und wäscht wie üblich. Kristallin erhält man die Substanz aus Methylenchlorid/DMF/Ether.

Ausbeute: 600 mg (71.0 % d. Th.)

Rf_D: 0.45

Fp.: 153-155° C

$C_{88}H_{103}N_{15}O_{18}S$ (1690.94)

L-Pyroglutamyl-D-phenylalanyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid-hydroacetat (Pyr-D-Phe-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-β-Ala-NH_2.HAc)

250 mg des geschützten Decapeptidamids werden eine Stunde bei 0° C in 10 ml über Kobalttrifluorid getrocknetem Fluor-

wasserstoff gerührt, nachdem man zur Substanz 0.1 ml Anisol sowie 0.1 ml Ethandithiol hinzugegeben hat.Nach Entfernen des Fluorwasserstoffs wird der Rückstand kurz über festem Kaliumhydroxid getrocknet und dann in 0.1 N Essigsäure aufgenommen. Um das Anisol bzw. Ethandithiol zu entfernen, wird die Lösung dreimal mit Ether ausgeschüttelt. Während die Etherphasen verworfen werden, behandelt man die wäßrige Phase mit Anionenaustauscher DOWEX 1X4 (Acetatform). Nach Abfiltrieren wird die das Peptid enthaltende Lösung lyophilisiert. Das Rohpeptid wird durch Verteilungschromatographie an Sephadex G 25 mit der Oberphase des Elutionsmittelsystems n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5), nachdem die Säule zuvor mit der Unterphase äquilibriert wurde, gereinigt. Um letzte Verunreinigungen zu entfernen, wird das so erhaltene Produkt an CM-Cellulose-Ionenaustauscher mit Ammoniumacetat in einem pH- und Konzentrationsgradienten (pH 4.8-7.0; 0.01-0.4 M) chromatographiert. Die das Peptid enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und mehrmals lyophilisiert.

Ausbeute: 55 mg (30.9 % d. Th.)

Rf: 0.58 (n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser: 15:10:3:12)

Fp.: 163-166° C

Aminosäureanalyse:	Glu	D-Phe	Ser	Tyr	Gly	Leu
	1.05	1.0	0.84	1.01	1.08	1.0
	Arg	Pro	β-Ala fällt mit D-Phe			
	1.01	1.05	zusammen			

$C_{59}H_{79}N_{15}O_{13}\cdot CH_3COOH$ (1266.42)

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-D-phenylalanyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (Z-Pyr-D-Phe-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-Gly-NH_2)

410 mg Z-Pyr-D-Phe-OH werden in üblicherweise mit 135 mg HOBt in 40 ml DMF gelöst, auf -5° C gekühlt und mit 206 mg DCCI versetzt. Nach einer Stunde gibt man das Octapeptidamid-hydrochlorid und 0.12 ml N-Methylmorpholin als Base hinzu. Nach zweistündigem Rühren bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur, filtriert man den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, entfernt das Lösungsmittel im Vakuum, nimmt in Essigester/n-Butanol auf und trocknet über Natriumsulfat, nachdem wie üblich gewaschen wurde. Die Substanz erhält man aus DMF/Ether.

Ausbeute: 1.15 g (68.04 % d. Th.)

Rf_D: 0.45

Fp.: 153-155° C

$C_{88}H_{103}N_{15}O_{18}S$ (1690.94)

L-Pyroglutamyl-D-phenylalanyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydroacetat (Pyr-D-Phe-Trp-Ser-Tyr-β-Ala-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2.HAc)

500 mg geschütztes Decapeptidamid werden wie beschrieben mit flüssigem Fluorwasserstoff in Gegenwart von Anisol und

Ethandithiol von den Schutzgruppen befreit. Das Rohpeptid wird wiederum im ersten Schritt durch Verteilungschromatographie an Sephadex G 25 im Elutionsmittelsystem n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5)-Oberphase und im zweiten Schritt durch Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose (Serva) mit Ammoniumacetat in einem pH- und Konzentrationsgradienten (0.01-0.4 M; pH 4.8-7.0) gereinigt. Durch mehrmaliges Lyophilisieren der das Peptid enthaltenden Fraktionen, erhält man die Substanz als weißer watteartiger Flaum.

Ausbeute: 128 mg (35 % d. Th.)

Rf: 0.62 (n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser: 15:10:3:12)

Fp.: 188-192° (Z.)

$C_{59}H_{79}N_{15}O_{13}.CH_3COOH$ (1266.42)

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-D-phenylalanyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid (Z-Pyr-D-Phe-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2)

400 mg Z-Pyr-D-Phe-OH werden zusammen mit 135 mg HOBt in 30 ml DMF gelöst, auf -5° C gekühlt und dann mit 206 mg DCCI versetzt. Nach einer Stunde gibt man 1.35 g H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-β-Ala-Leu-Arg(Mbs)-Pro-β-Ala-NH_2.HCl und 0.12 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt wiederum zwei Stunden bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur und arbeitet wie üblich auf. Die Substanz erhält man aus Methylenchlo-

rid/DMF/Ether.

Ausbeute: 1.23 g (72.3 % d. Th.)

Rf_D:0.48

Fp.: 161-163° C

$C_{89}H_{105}N_{15}O_{18}S$ (1704.96)

L-Pyroglutamyl-D-phenylalanyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-β-alanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-β-alaninamid-hydroacetat (Pyr-D-Phe-Trp-Ser-Tyr-β-Ala-Leu-Arg-Pro-β-Ala-NH_2.HAc)

500 mg des geschützten Decapeptidamids werden bei 0° eine Stunde in Gegenwart von Anisol und Ethandithiol gerührt. Nach üblicher Aufarbeitung und oben beschriebener Säulenchromatographie ist die Substanz in den verwendeten Fließmittelsystemen A und D sowie n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser dünnschichtchromatographisch rein. Die Substanz ist nach mehrmaligem Lyophilisieren ein weißes Pulver.

Ausbeute: 140 mg (39.2 % d. Th.)

Rf: 0.63 (n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser: 15:10:3:12)

Fp.: 178-181° (Z.)

$C_{60}H_{81}N_{15}O_{13}.CH_3COOH$ (1280.47)

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-D-phenylalanyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-N^{ω}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-arginyl-homo-prolyl-glycinamid (Z-Pyr-D-Phe-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2)

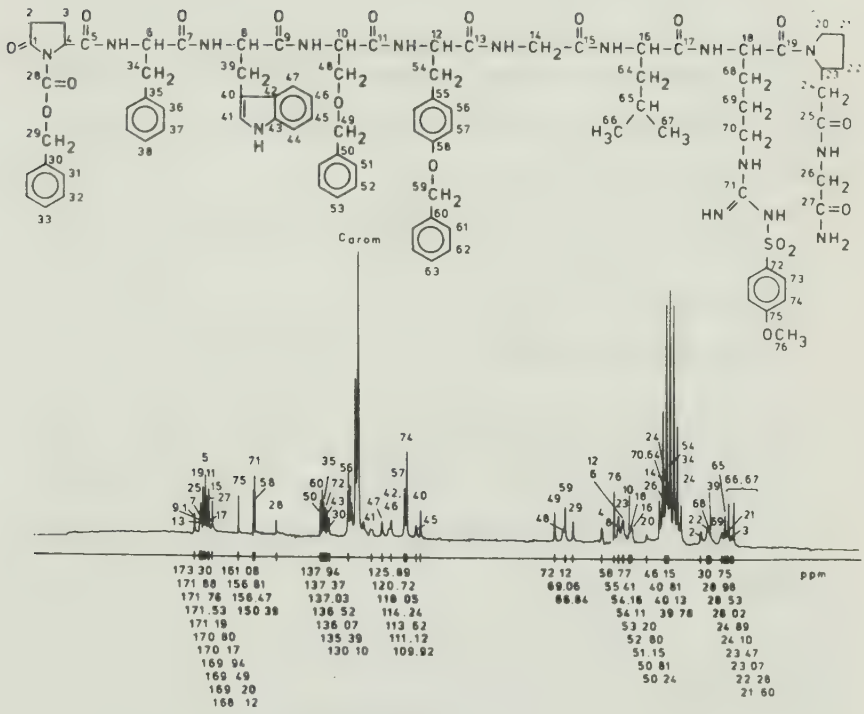


Abb. 88: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Pyr-D-Phe-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2, 100 mg in 1 ml DMSO-d_6, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 133 000 Pulsinterferogramme

0.7 g Z-Pyr-D-Phe-OH und 374 mg HOBt werden in 50 ml DMF gelöst und auf -5° C gekühlt. Dann gibt man 352 mg DCCI und nach einer Stunde 2g H-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Mbs)-h-Pro-Gly-NH_2.HCl und 0.17 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach üblicher Aufarbeitung erhält man die Substanz aus DMF/Ether.

Ausbeute: 2.13 g (84.1 % d. Th.)

Rf_D: 0.44

Fp.: 157-159° C

$C_{88}H_{103}N_{15}O_{18}S$ (1690.94)

L-Pyroglutamyl-D-phenylalanyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-glycyl-L-leucyl-L-arginyl-homo-prolyl-glycinamid-hydroacetat (Pyr-D-Phe-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-h-Pro-Gly-NH_2.HAc)

1 g des geschützten Decapeptidamids werden in 20 ml flüssigem, zuvor über Kobalttrifluorid getrocknetem, Fluorwasserstoff in Gegenwart von Anisol und Ethandithiol eine Stunde bei 0° C gerührt. Nach Verdrängen des Fluorwasserstoffs mit Stickstoff wird kurz über festem Kaliumhydoxid getrocknet. Nach Aufnehmen des Rückstandes in 0.1 N Essigsäure, schüttelt man dreimal mit Ether aus; während die Etherphasen verworfen werden, behandelt man die wässrige Phase mit DOWEX-1X4-Anionenaustauscher (Acetatform) und lyophilisiert nach Filtration. Das Rohpeptid wird durch

die oben beschriebenen chromatographischen Verfahren gereinigt.

Ausbeute: 0.24 g (33.6 % d. Th.)

Rf: 0.59 (n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser: 15:10:3:12)

Fp.: 205-210° C (Z.)

Aminosäureanalyse:	Glu	Phe	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg
	1.03	0.94	0.9	0.97	2.08	1.0	1.0

$C_{59}H_{79}N_{15}O_{13}$ (1266.42)

p-Methoxybenzolsulfonylchlorid (Mbs-Cl)

Die Substanz wird nach Literatur 220 synthetisiert.
80 g Anisol werden in 300 ml absolutem Chloroform gelöst, die Lösung auf -10° C gekühlt und tropfenweise unter Rühren so mit insgesamt 172.4 g Chlorsulfonsäure versetzt, daß die Temperatur nicht über 0° ansteigt. Nach beendeter Reaktion wird das Kältebad entfernt und die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt. Nach beendeter Gasentwicklung wird auf Eis gegossen. Die wässrige Phase wird abgetrennt und noch zweimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformphasen werden mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Chloroforms wird das verbleibende Öl im Wasserstrahlvakuum destilliert.

Ausbeute: 93.3 g (61 % d. Th.)

Fp.: 43° C

Rf_D: 0.76

$C_7H_7O_3SCl$ (206.65)

Allgemeines Verfahren zur Darstellung von N^{α}-p-Methoxybenzolsulfonyl-aminosäuren

0.1 Mol der entsprechenden Aminosäure werden in 50 ml Dioxan/Wasser (1:1) gelöst, auf 0^{o} C gekühlt und mit 2 N NaOH auf pH 9 eingestellt. Dann gibt man tropfenweise unter Rühren 0.11 Mol p-Methoxybenzolsulfonylchlorid in Dioxan hinzu, wobei mit einem pH-Staten mit 2 N NaOH ein pH-Wert von 9.5 aufrechterhalten wird. Nach erfolgter Zugabe des Reagenzes, rührt man weitere zwei Stunden bei 0^{o} und 4 Stunden bei Raumtemperatur. Die erhaltene Lösung wird nach Entfernen des Dioxans im Vakuum, zweimal mit Ether ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird mit Essigester überschichtet und mit 3 N HCl auf pH 2.5 angesäuert. Nach Abtrennen der Essigesterphase wird diese mit gesättigter NaCl-Lösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Kristallin erhält man die Mbs-Aminosäuren aus Essigester/Petrolether.

N^{ε}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-lysin (H-Lys(Mbs)-OH)

7.28 g L-Lysin werden in 200 ml Wasser mit 12 g Kupfercarbonat am Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen wird vom überschüssigen Kupfercarbonat abfiltriert. Die so erhaltene Lösung wird mit 150 ml Aceton versetzt und auf 0^{o} C gekühlt, dann tropft man 8.26 g p-Methoxybenzolsulfonylchlorid in 50 ml Aceton hinzu, wobei mit einem pH-Staten mit 2 N NaOH ein pH-Wert von 8 aufrechterhalten wird. Der

asgefallene Kupferkomplex wird abgesaugt, in Wasser suspendiert und mit Essigsäure auf pH 4 gebracht. Zur Zerstörung des Kupferkomplexes wird bei Raumtemperatur eine Stunde Schwefelwasserstoff eingeleitet, das ausgefallene Kupfersulfid abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingeengt, wobei die Substanz ausfällt. Nach Absaugen und Trocknen über P_2O_5, wird aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 3.2 g (28 % d. Th.)

Rf_D: 0.22 Rf_A: 0.42

Fp.: >210° C

$C_{13}H_{20}N_2O_5S$ (316.38)

N^{δ}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-ornithin

Die Substanz wird analog der zuvor beschriebenen Lysinverbindung synthetisiert.

Ansatz: 20 g L-Ornithin, 30 g Kupfercarbonat, 27.6 g p-Methoxybenzolsulfonylchlorid

Ausbeute: 11.2 g (27 % d. Th.)

Rf_D: 0.20 Rf_A: 0.39

Fp.: >200° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +17.2 (c=1, MeOH)

$C_{12}H_{18}N_2O_5S$ (302.35)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ε}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-lysin-Dicyclohexylammoniumsalz (Z-Lys(Mbs)-OH.DCHA)

3.06 g H-Lys(Mbs)-OH werden in 50 ml Wasser/Aceton (1:1)

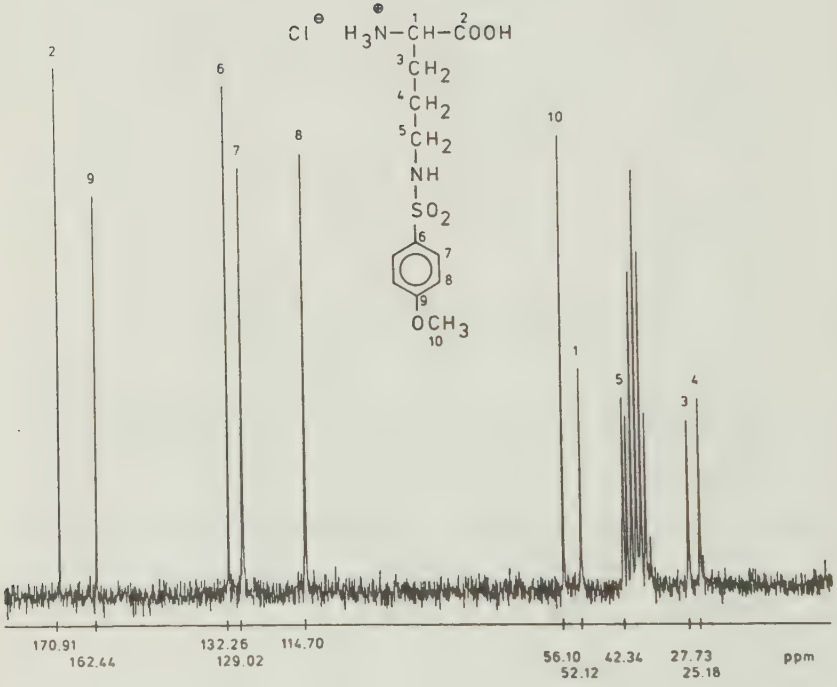


Abb. 89: ^{13}C-NMR-Spektrum von H-Lys(Mbs)-OH.HCl, 300 mg in 1 ml DMSO-d_6, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 15 000 Pulsinterferogramme

suspendiert und bei 0^{o} C simultan unter Rühren tropfenweise mit 5 ml 2 N NaOH und 1.2 ml Benzyloxycarbonylchlorid versetzt. Man rührt zwei Stunden bei 0^{o} C und eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach Abziehen des Acetons im Vakuum wird zweimal mit Ether ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird mit Essigester überschichtet und unter Kühlung mit 2 N HCl auf pH 2.5 angesäuert. Nach Abtrennen der Essigesterphase, wird die wässrige Lösung noch zweimal mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Mit Dicyclohexylamin wird in das DCHA-Salz überführt.

Ausbeute: 3.43 g (57 % d. Th.)

Rf_D: 0.36 Rf_A: 0.78

Fp.: 140^{o} (Z.)

$\{\alpha\}_D^{20}$: +7.9 (c=1, DMF)

$C_{33}H_{49}N_3O_7S$ (603.82)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{δ}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-ornithin (Z-Orn(Mbs)-OH)

5.74 g H-Orn(Mbs)-OH werden in 50 ml Dioxan/Wasser (1:1) suspendiert und auf 0^{o} C gekühlt, dann gibt man unter Rühren tropfenweise 2.47 ml Benzyloxycarbonylchlorid hinzu, wobei mit dem pH-Stat mit 2 N NaOH ein pH-Wert von 9 eingehalten wird. Nach 2 Stunden bei 0^{o} C und 6 Stunden bei Raumtemperatur wird in Analogie zur Lysinverbindung aufgearbeitet. Kristallin erhält man die Verbindung aus Essig-

ester/Petrolether.

Ausbeute: 5.65 g (68 % d. Th.)

Rf_D: 0.38 Rf_A: 0.78

Fp.: 105° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: -1.5 (c=1, DMF)

$C_{20}H_{24}N_2O_7S$ (436.48)

N^{α}-tert.-Butyloxycarbonyl-N^{ε}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-Lysin-Dicyclohexylammoniumsalz (BOC-Lys(Mbs)-OH.DCHA)

3.02 g H-Lys(Mbs)-OH werden in 50 ml Dioxan/Wasser (1:1) suspendiert und nach Kühlen auf 0° C tropfenweise mit 1.61 ml BOC-Azid versetzt, wobei mit 2 N NaOH mittels eines pH-Staten ein pH-Wert von 9.5 eingehalten wird. Nach zwei Stunden läßt man auf Raumtemperatur kommen und rührt weitere 6 Stunden bei dieser Temperatur. Nach Abziehen des Dioxans wird dreimal mit Ether ausgeschüttelt, die wässrige Phase mit Essigester überschichtet und mit 3 N HCl unter Kühlung auf pH 2.5 gebracht. Nach üblicher Aufarbeitung überführt man mit Dicyclohexylamin in das Salz.

Ausbeute: 3.5 g (59 % d. Th.)

Rf_D: 0.37 Rf_A: 0.83

Fp.: 129° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +8.5 (c=1, DMF)

$C_{30}H_{50}N_3O_7S$ (596.81)

N^{α}-tert.-Butyloxycarbonyl-N^{δ}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-ornithin (BOC-Orn(Mbs)-OH)

In Analogie zur Lysinverbindung werden 2.88 g H-Orn(Mbs)-OH mit 1.61 ml BOC-Azid bei pH 9.5 umgesetzt. Die Substanz erhält man kristallin aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 2.75 g (74 % d. Th.)

Rf_D: 0.41

Fp.: 151° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: -2.9 (c=2, DMF)

$C_{17}H_{26}N_2O_7$ (370.40)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{im}-p-Methoxybenzolsulfonyl-L-histidin (Z-His(Mbs)-OH)

5.79 g nach Literatur 159 dargestelltes Z-His-OH werden in 75 ml Dioxan/Wasser (1:1) suspendiert, auf 0° C gekühlt und unter Rühren tropfenweise mit 4.44 g p-Methoxybenzolsulfonylchlorid bei pH 9 versetzt. Unter pH-Statkontrolle rührt man zwei Stunden bei 0° C und vier Stunden bei Raumtemperatur. Die Aufarbeitung erfolgt analog den zuvor beschriebenen Substanzen. Kristallisiert wird aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 6.9 g (75.0 % d. Th.)

Fp.: 84° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +10.2 (c=1, MeOH)

$C_{21}H_{21}N_3O_7S$ (459.48)

2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TIP-Cl)

Die Verbindung wird nach Literatur 157 dargestellt.

102.1 g 1.3.5-Triisopropylbenzol werden in 500 ml absolutem Chloroform unter Feuchtigkeitsausschluß gelöst und nach Kühlung auf 0° C, gibt man unter Rühren 120 ml Chlorsulfonsäure tropfenweise so zu, daß die Temperatur 5° C nicht übersteigt. Nach beendeter Zugabe rührt man 30 min bei 0° und eine Stunde bei Raumtemperatur und gibt dann die Reaktionsmischung vorsichtig auf Eis. Das Produkt wird aus dieser Mischung durch mehrmalige Extraktion mit Chloroform in die organische Phase überführt. Die vereinigten Chloroformphasen werden zweimal mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels kristallisiert man den Rückstand aus n-Hexan um.

Ausbeute: 128.7 g (85 % d. Th.)

Fp.: 96-98° C

$C_{15}H_{23}O_2SCl$ (302.86)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginin (Z-Arg(TIP)-OH)

11.1 g Z-Arg-OH werden in 230 ml Aceton suspendiert und unter Rühren mit 36 ml 4 N NaOH versetzt. Nach Auflösung kühlt man auf 0° C und gibt innerhalb einer halben Stunde tropfenweise 24.1 g 2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid in 60 ml Aceton hinzu. Man rührt zwei Stunden bei 0° und vier Stunden bei Raumtemperatur, dann wird das Aceton im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 200 ml Wasser verdünnt. Die so erhaltene Lösung wird mit Ether dreimal ausgeschüttelt, dann überschichtet man die wässrige Phase

mit Essigester und säuert mit 3 N HCl unter Kühlung auf pH 2.5 an. Nach Abtrennen der organischen Phase wird mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Kristallin erhält man die Substanz aus Ether/Petrolether.

Ausbeute: 10.5 g (50.7 % d. Th.)

Rf_D: 0.67

Fp.: 155° C

$C_{29}H_{42}N_4O_6S$ (574.74)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{im}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-histidin (Z-His(TIP)-OH)

5.79 g Z-His-OH werden in 50 ml Aceton/Wasser (1:1) suspendiert, dann wird nach Kühlung mit 2 N NaOH auf pH 9 gebracht. Es folgt die tropfenweise Zugabe von 7.4 g 2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid unter Aufrechterhaltung des pH-Wertes mit einem pH-Staten. Man rührt den Ansatz zwei Stunden bei 0° C und zwei Stunden bei Raumtemperatur und entfernt anschließend das Aceton im Vakuum. Die weitere Aufarbeitung erfolgt analog dem Argininderivat.

Ausbeute: 10 g (89.9 % d. Th.)

Rf_D: 0.52 Rf_A: 0.79

Fp.: 117-118° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +11.2 (c=1, MeOH)

$C_{29}H_{37}N_3O_6S$ (555.69)

N^{α}-tert.-Butyloxycarbonyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginin (BOC-Arg(TIP)-OH)

5.74 g Z-Arg(TIP)-OH werden mit 20 % HBr/Essigsäure (50 ml) übergossen und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wird im Vakuum zur Trockene gebracht. Nach Trocknen über festem Kaliumhydroxid im Hochvakuum, verbleibt die Substanz als Öl, das nicht weiter aufgearbeitet wird. Nach Auflösen in 50 ml Dioxan/Wasser (1:1), kühlt man auf 0^{o} C und gibt 16 ml BOC-Azid tropfenweise hinzu, dabei wird mit 2 N NaOH am pH-Staten auf pH 10 gehalten. Nach beendeter Reaktion wird das Dioxan im Vakuum entfernt, die Lösung mit 100 ml Wasser verdünnt und dreimal mit Ether ausgeschüttelt. Die wäßrige Lösung überschichtet man mit Essigester und säuert mit fester Citronensäure auf pH 3 an. Nach Abtrennen der organischen Phase wird die Wasserphase noch zweimal mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Kristallisation erfolgt aus Ether/n-Hexan.

Ausbeute: 3.9 g (72.2 % d. Th.)

Rf_{D}: 0.68

Fp.: 187^{o} C (Z.)

$C_{26}H_{44}N_{4}O_{6}S$ (540.72)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginin-methylester (Z-Arg(TIP)-OMe)

5.75 g Z-Arg(TIP)-OH werden zusammen mit 5 ml Methanol, 0.5 ml Pyridin und 0.34 g HOBt in 2.5 ml DMF, in 50 ml Methylenchlorid gelöst und auf -5° C gekühlt, dann gibt man 2.06 g DCCI hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei dieser Temperatur und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffes wird wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation erfolgt aus Ether/n-Hexan.

Ausbeute: 4.13 g (70.1 % d. Th.)

Rf_D: 0.86

Fp.: 88-91°—

$C_{30}H_{44}N_4O_6S$ (588.77)

N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginin-methylester-hydrochlorid (H-Arg(TIP)-OMe.HCl)

3.6 g Z-Arg(TIP)-OMe werden in 50 ml Methanol gelöst, mit 0.25 g Palladium/Aktivkohle-Katalysator versetzt und mit Wasserstoff bei einem pH-Wert von 4 (0.1 N HCl) hydriert. Nach beendeter Reaktion wird der Katalysator über Cellite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus Methylenchlorid/Methanol/Ether kristallisiert.

Ausbeute: 1.72 g (57.3 % d. Th.)

Rf_D: 0.63

Fp.: 101-103° C

$C_{22}H_{39}N_4O_4SCl$ (491.1)

m-Trifluormethylbenzolsulfonylchlorid (TMbs-Cl)

Die Substanz wird nach Literatur 220,221 synthetisiert.

1.) Darstellung des Sulfonsäure-Natriumsalzes:

98 g α.α.α-Trifluortoluol werden bei 0° C mit 100 g 62 % Oleum versetzt. Man rührt zwei Stunden bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur. Die so erhaltene Lösung wird unter Rühren in eine gesättigte Natriumchloridlösung getropft. Das ausgefallene Rohprodukt wird abgenutscht und über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 132 g (94 % d. Th.)

2.) Darstellung des Sulfochlorids:

Das zuvor dargestellte Natriumsalz wird unter Kühlung mit 260 g PCl_5 in Portionen versetzt und nach beendeter Zugabe zwei Stunden auf 120° C erhitzt. Nach Abkühlen fügt man 500 ml absolutes Benzol hinzu, kocht kurz auf und filtriert vom Unlöslichen ab. Nach Abziehen des Benzols wird der verbliebene Rückstand zweimal im Vakuum über eine 20 cm Vigreuxkolonne fraktioniert.

Ausbeute: 88.8 g (58 % d. Th.)

Kp_2: 55° C Lit: Kp_6: 88-90° C

m-Trifluormethylbenzolsulfonyl-β-alanin (TMbs-β-Ala-OH)

4.5 g β-Alanin werden in 20 ml 2 N NaOH/30 ml Aceton suspendiert und nach Kühlen auf 0° C unter Rühren mit 12.2 g m-Trifluormethylbenzolsulfonylchlorid in 20 ml Aceton

tropfenweise versetzt. Man rührt den Ansatz zwei Stunden bei 0^{o} und drei Stunden bei Raumtemperatur; anschließend wird wie bei den Mbs-Aminosäuren beschrieben, aufgearbeitet. Kristallisation erfolgt aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 9.5 g (66 % d. Th.)

Rf_{D}: 0.30

Fp.: 100^{o} C

$C_{10}H_{10}NO_4SF_3$ (288.18)

m-Trifluormethylbenzolsulfonyl-glycin (TMbs-Gly-OH)

7.51 g Glycin werden in 100 ml Dioxan/Wasser (1:1) gelöst, auf 0^{o} C gekühlt und mit 2 N NaOH am pH-Staten auf pH 9 gebracht. Dann gibt man unter Rühren tropfenweise 26.91 g m-Trifluormethylbenzolsulfochlorid in 50 ml Dioxan hinzu, wobei der pH-Wert konstant bei 9 gehalten wird. Nach zwei Stunden bei 0^{o} C und zwei Stunden bei Raumtemperatur wird wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation erfolgt aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 25.2 g (94 % d. Th.)

Rf_{D}: 0.27

Fp.: 144^{o} C

$C_9H_8NO_4SF_3$ (269.22)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{im}-m-Trifluormethylbenzolsulfonyl-L-histidin (Z-His(TMbs)-OH)

5.79 g Z-His-OH werden in 100 ml Dioxan/Wasser suspendiert

und auf 0^{o} C gekühlt, dann gibt man unter Rühren tropfenweise 5.87 g m-Trifluormethylbenzolsulfonylchlorid in 40 ml Dioxan hinzu, wobei mit 2 N NaOH mit dem pH-Staten ein pH-Wert von 9 eingehalten wird. Nach beendeter Reaktion wird das Dioxan am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand dann mit 50 ml Wasser verdünnt. Die wäßrige Lösung schüttelt man dreimal mit Ether aus, überschichtet dann mit Essigester und säuert mit 3 N HCl unter Kühlung auf pH 3 an. Nach Abtrennen der organischen Phase wird mit Eiswasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Kristallisation erfolgt aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 7.1 g (71 % d. Th.)

Rf_D: 0.26 Rf_A: 0.75

Fp.: 150^{o} C

$C_{21}H_{18}N_3O_6SF_3$ (497.45)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ω}-m-Trifluormethylbenzolsulfonyl-L-arginin (Z-Arg(TMbs)-OH)

3.08 g Z-Arg-OH werden in 100 ml Aceton/Wasser (1:1) suspendiert und mit 4 N NaOH auf pH 12 gebracht. Nach Auflösung kühlt man auf 0^{o} C und gibt unter Rühren 6 g m-TMbs-Cl gelöst in 50 ml Aceton unter Erhalt des pH-Wertes tropfenweise hinzu. Man läßt zwei Stunden bei 0^{o} C und vier Stunden bei Raumtemperatur reagieren und arbeitet dann wie üblich auf. Die Substanz erhält man aus Methylenchlorid/Petrolether.

Ausbeute: 4.05 g (79.9 % d. Th.)

Rf_D: 0.46

Fp.: 148-150° C

$C_{21}H_{23}N_4O_6SF_3$ (506.5)

N^{α}-tert.-Butyloxycarbonyl-N^{ω}-m-Trifluormethylbenzolsulfonyl-L-arginin (BOC-Arg(TMbs)-OH)

2 g Z-Arg(TMbs)-OH werden in 30 ml 25 % HBr/Essigsäure eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und nach beendeter Abspaltung der Z-Schutzgruppe im Vakuum vom Reaktionsmedium befreit. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum über festem Kaliumhydoxid wird das erhaltene Öl in 50 ml Dioxan/Wasser gelöst, auf 0° C gekühlt und mit 7 ml BOC-Azid in 25 ml Dioxan tropfenweise versetzt, dabei wird mit 2 N NaOH am pH-Stat bei pH 10 gehalten. Der Ansatz wird wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation erfolgt aus Ether/n-Hexan.

Ausbeute: 1.2 g (63.1 % d. Th.)

Fp.: 163-165° C

$C_{18}H_{25}N_4O_6SF_3$ (482.48)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinmethylester (Z-Arg(TIP)-Pro-Gly-OMe)

14.89 g Z-Arg(TIP)-OH werden zusammen mit 3.5 g HOBt in 100 ml DMF gelöst und nach Kühlen auf -5° C mit 5.34 g

DCCI versetzt. Nach einer Stunde gibt man 5.77 g H-Pro-GlyOMe.HCl und 3.13 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0^{o} und über Nacht bei Raumtemperatur. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 13.74 g (71.3 % d. Th.)

Rf_D: 0.74 Rf_A: 0.41

Fp.: 97-98° C

$C_{37}H_{54}N_6O_8S$ (742.94)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (Z-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2)

12.75 g Z-Arg(TIP)-Pro-Gly-OMe werden in 150 ml Methanol gelöst und nach Kühlen auf 0^{o} C mit gasförmigem Ammoniak gesättigt. Nach 48 Stunden ist die Reaktion beendet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand aus Methylenchlorid/Ether zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 11.8 g (95.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.30 Rf_A: 0.65

Fp.: 131-133° C

$C_{36}H_{53}N_7O_7S$ (727.93)

N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydrochlorid (H-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2.HCl

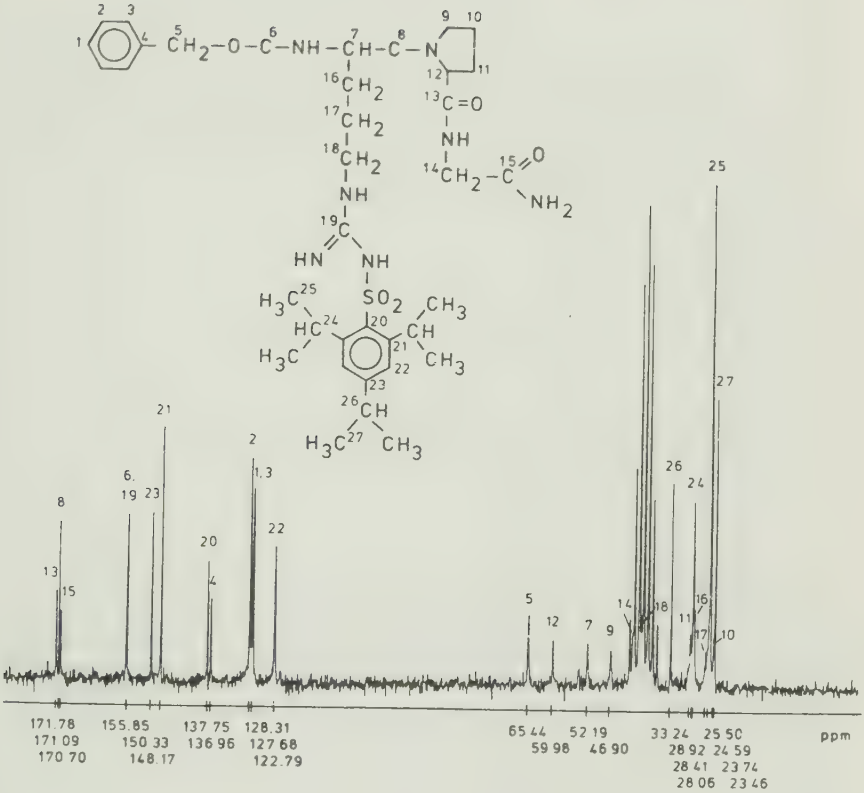


Abb. 90: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2, 220 mg in 1 ml DMSO-d_6, 22.63 MHz, protonenbreitband-entkoppelt, 6100 Pulsinterferogramme

10 g Z-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2 werden in 100 ml Methanol gelöst, mit 1 g Palladium/Aktivkohle-Katalysator versetzt und mit Wasserstoff im Durchfluß hydriert, wobei mit 0.1 N HCl mit Hilfe des pH-Staten ein pH-Wert von 4 eingehalten wird. Nach beendeter Reaktion wird über Cellite abfiltriert und nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, aus Methanol/Ether auskristallisiert.

Ausbeute: 5.4 g (62.3 % d. Th.)

Rf_D: 0.22

Fp.: 115° C

$C_{28}H_{48}N_7O_5SCl$ (630.25)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-γ-aminobutyryl-L-leucinmethylester (BOC-γ-Abu-Leu-OMe)

8.12 g BOC-γ-Abu-OH werden nach Auflösen in 100 ml Methylenchlorid auf -5° C gekühlt und mit 5.4 g HOBt und 8.24 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde bei 0° C folgt die Zugabe von 7.26 g H-Leu-OMe.HCl und 4.4 ml N-Methylmorpholin. Der Ansatz wird weitere zwei Stunden bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und dann wie üblich aufgearbeitet. Nach Abziehen des Lösungsmittels verbleibt die Substanz als Öl, das im Tiefkühlschrank kristallisiert.

Ausbeute: 11.58 g (87.5 % d. Th.)

Rf_D: 0.62

Fp.: 46° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: -24.4 (c=1,08, MeOH)

$C_{16}H_{30}N_2O_5$ (330.43)

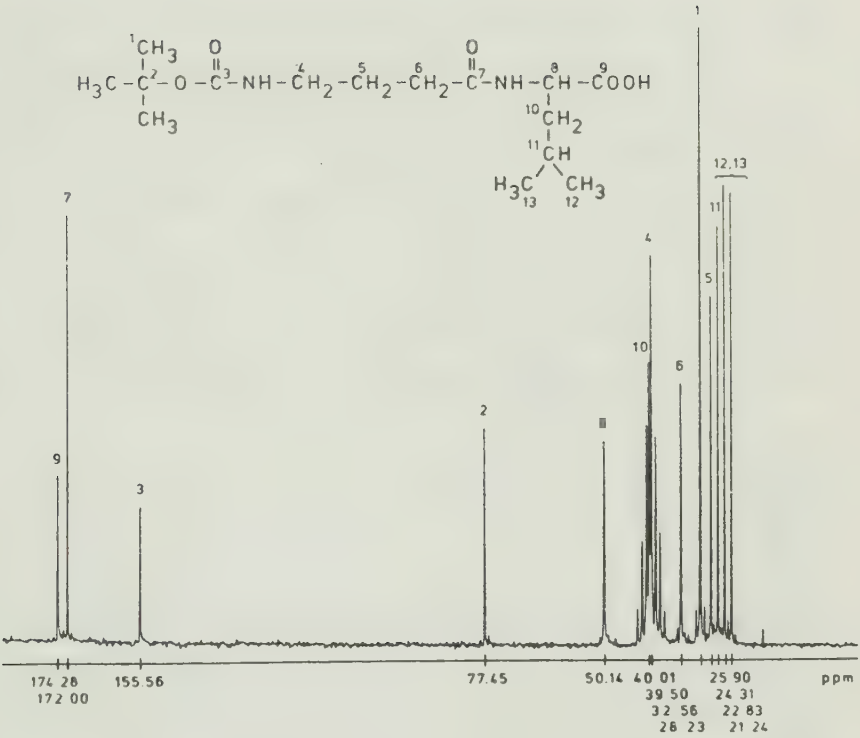


Abb. 91: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-γ-Abu-Leu-OH, 300 mg in 1 ml DMSO-d_6, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 11 100 Pulsinterferogramme

N-tert.-Butyloxycarbonyl-γ-aminobutyryl-L-leucin (BOC-γ-Abu-Leu-OH)

10.1 g BOC-γ-Abu-Leu-OMe werden in 100 ml Methanol gelöst und unter Rühren mit 16 ml 2 N NaOH tropfenweise verseift. Nach beendeter Reaktion wird der Ansatz unter Kühlung mit 2 N HCl neutralisiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 50 ml Wasser versetzt, mit Essigester überschichtet und unter Kühlung mit 2 N HCl auf pH 3 angesäuert. Die organische Phase wird abgetrennt und mit Wasser neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Kristallisiert wird aus Methylenchlorid/Petrolether.

Ausbeute: 8.2 g (84.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.36

Fp.: 62-65° C

$C_{15}H_{28}N_2O_4$ (316.40)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-γ-aminobutyryl-L-leucyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (BOC-γ-Abu-Leu-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2)

1.67 g BOC-γ-Abu-Leu-OH werden zusammen mit 0.72 g HOBt in 50 ml Methylenchlorid gelöst und nach Kühlen auf -5° C mit 1.08 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde gibt man 3.5 g H-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2.HCl und 0.61 ml N-Methylmorpholin hinzu und rührt weitere zwei Stunden bei 0° und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren des ausgefal-

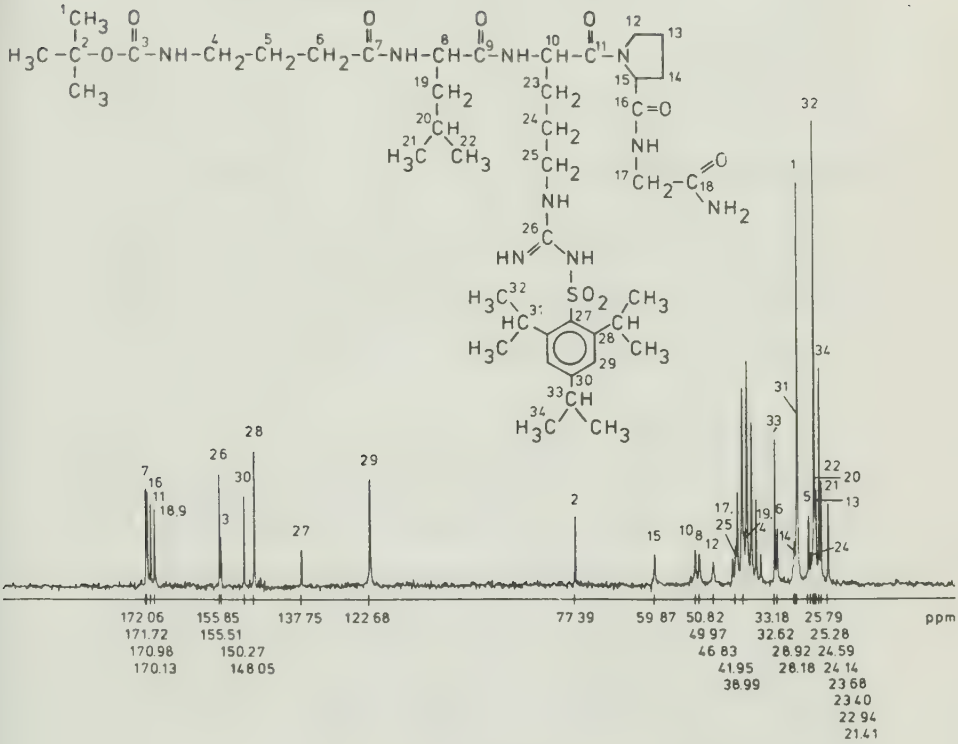


Abb. 92: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-γ-Abu-Leu-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2, 170 mg in 1 ml DMSO-d_6, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 17 000 Pulsinterferogramme

lenen Dicyclohexylharnstoffes und Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wird wie üblich gewaschen und getrocknet. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 3.4 g (72.3 % d. Th.)

Rf_D: 0.69

Fp.: 133-135° C

$C_{43}H_{73}N_9O_9S$ (892.18)

γ-Aminobutyryl-L-leucyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydrochlorid (H-γ-Abu-Leu-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2.HCl)

3.1 g BOC-Pentapeptidamid werden mit 50 ml 1.2 N HCl/Essigsäure übergossen und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die so erhaltene Lösung wird unter Rühren in 250 ml eiskalten Ether getropft. Der gebildete Niederschlag wird abgenutscht, mit wenig eiskaltem Ether gewaschen und über festem Kaliumhydoxid im Ölpumpenvakuum getrocknet. Umkristallisiert wird aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 2.5 g (87.1 % d. Th.)

Rf_D: 0.12

Fp.: 153-155° C

$C_{38}H_{66}N_9O_7SCl$ (828.52)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-γ-aminobutyryl-L-leucyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (BOC-Ser(Bzl)-Tyr

(Bzl)-γ-Abu-Leu-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2)

1.51 g BOC-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-OH werden zusammen mit 0.37 g HOBt im 35 ml DMF gelöst und nach Kühlen auf -5° C mit 0.57 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde bei 0° C gibt man 2.07 g H-γ-Abu-Leu-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2.HCl und 0.28 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt zwei Stunden bei 0° C und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht und filtriert dann vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum verfährt man wie üblich. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Ether.

Ausbeute: 2.1 g (57.6 % d. Th.)

Rf_D: 0.56

Fp.: 110-113° C

$C_{69}H_{99}N_{11}O_{13}S$ (1322.68)

O-Benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-γ-aminobutyryl-L-leucyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydrochlorid (H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-γ-Abu-Leu-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2.HCl)

1.6 g des BOC-geschützten Heptapeptidamids werden mit 30 ml 1.2 N HCl/Essigsäure in Gegenwart von 0.5 ml Anisol eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und dann unter kräftigem Rühren in 250 ml eiskalten Ether getropft. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit wenig kaltem Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 1.35 g (88.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.44

Fp.: 148-151° C

$C_{64}H_{92}N_{11}O_{11}SCl$ (1259.02)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-γ-aminobutyryl-L-leucyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-Larginyl-L-prolyl-glycinamid (BOC-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-γ-Abu-Leu-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2)

484 mg BOC-Trp-OCP werden zusammen mit 1.26 g H-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-γ-Abu-Leu-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2.HCl und 0.12 ml N-Methylmorpholin sowie einer Spatelspitze HOBt in 30 ml DMF gelöst und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in Essigester, dem etwas n-Butanol als Lösungsvermittler hinzu gesetzt wird, gelöst und wie üblich gewaschen und dann über Natriumsulfat getrocknet. Die Substanz wird aus Methylenchlorid/Ether kristallisiert.

Ausbeute: 1.2 g (79.4 % d. Th.)

Rf_D: 0.61

Fp.: 128-133° C

$C_{80}H_{109}N_{13}O_{14}S$ (1508.89)

L-Tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-tyrosyl-γ-aminobutyryl-L-leucyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydrochlorid (H-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-γ-Abu-Leu-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2.HCl)

0.9 g des BOC-geschützten Octapeptidamids werden nach Zugabe von 0.15 ml Anisol und 0.15 ml Ethandithiol unter Stickstoffatmosphäre mit 50 ml 1.2 N HCl/Essigsäure eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt; die erhaltene Lösung wird dann in 150 ml eiskalten Ether getropft, der Niederschlag nach Absaugen und waschen mit Ether über festem Kaliumhydroxid getrocknet und aus Methanol/Ether zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 0.7 g (81.3 % d. Th.)

Rf_D: 0.47

Fp.: 153° C (Z.)

$C_{75}H_{102}N_{13}O_{12}SCl$ (1445.24)

N-Benzyloxycarbonyl-L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-O-benzyl-L-seryl-O-benzyl-L-tyrosyl-γ-aminobutyryl-L-leucyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid (Z-Pyr-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-γ-Abu-Leu-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2)

152 mg Z-Pyr-His-OH werden zusammen mit 0.05 g HOBt in 25 ml DMF gelöst und nach Kühlen auf -5° C mit 78 mg DCCI versetzt, eine Stunde bei 0° C gerührt und dann gibt man 0.5 g H-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-γ-Abu-Leu-Arg(TIP)-Pro-Gly-NH_2.HCl und 0.038 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur. Die Aufarbeitung des Ansatzes wird wie üblich vorgenommen. Kristallisation erfolgt aus DMF/Ether.

Ausbeute: 0.5 (73.5 % d. Th.)

Rf_D: 0.46

Fp.: 130-132° C

$C_{94}H_{119}N_{17}O_{17}S$ (1791.15)

Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-γ-aminobutyryl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-glycinamid-hydroacetat (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-γ-Abu-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2.HAc)

0.25 g geschütztes Decapeptidamid werden nach Zugabe von 0.2 ml Anisol und 0.2 ml Ethandithiol mit 10 ml flüssigem Fluorwasserstoff eine Stunde bei 0° gerührt. Nach Abziehen des Fluorwasserstoffs wird der über Kaliumhydroxid getrocknete Rückstand in 25 ml 0.1 N Essigsäure aufgenommen und dreimal mit Ether ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase behandelt man mit DOWEX-1X4-Anionenaustauscher (Acetatform) und gefriertrocknet nach Filtration. Nach säulenchromatographischer Reinigung, die analog zu den vorhergegangenen Peptiden vorgenommen wird, ist die Substanz analysenrein.

Ausbeute: 40 mg (23.6 % d. Th.)

Rf: 0.61 (n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser: 15:10:3:12)

Fp.: 162-165° C (Z.)

Aminosäureanalyse:	Glu	His	Ser	Tyr	γ-Abu	Leu
	1.08	1.06	0.96	0.96	0.95	1.0
	Arg	Pro	Gly			
	1.06	0.96	1.0			

$C_{57}H_{79}N_{17}O_{13}\cdot CH_3COOH$ (1270.42)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropyl-benzolsulfonyl-L-arginin-methylester (BOC-Pro-Arg(TIP)-OMe)

0.65 g BOC-Pro-OH werden mit 0.41 g HOBt in 35 ml DMF gelöst und dann nach Kühlung auf -5° C mit 0.63 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde bei 0° C gibt man 1.47 g H-Arg (TIP)-OMe.HCl und 0.33 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffes, zieht man das Lösungsmittel im Vakuum ab, nimmt den Rückstand in Essigester auf, und trocknet nach üblichem Waschen über Natriumsulfat. Die Substanz wird aus Essigester/n-Hexan kristallisiert.

Ausbeute: 1.1 g (57 % d. Th.)

Rf_D: 0.58

Fp.: 90-92° C

$C_{32}H_{53}N_5O_7S$ (637.92)

L-Prolyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginin-methylester-hydrochlorid (H-Pro-Arg(TIP)-OMe.HCl)

0.73 g der geschützten Dipeptidverbindung werden mit 40 ml 1.2 N HCl/Essigsäure übergossen, eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und die erhaltene Lösung unter Rühren in 150 ml eiskalten Ether gegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit wenig Ether gewaschen und über Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

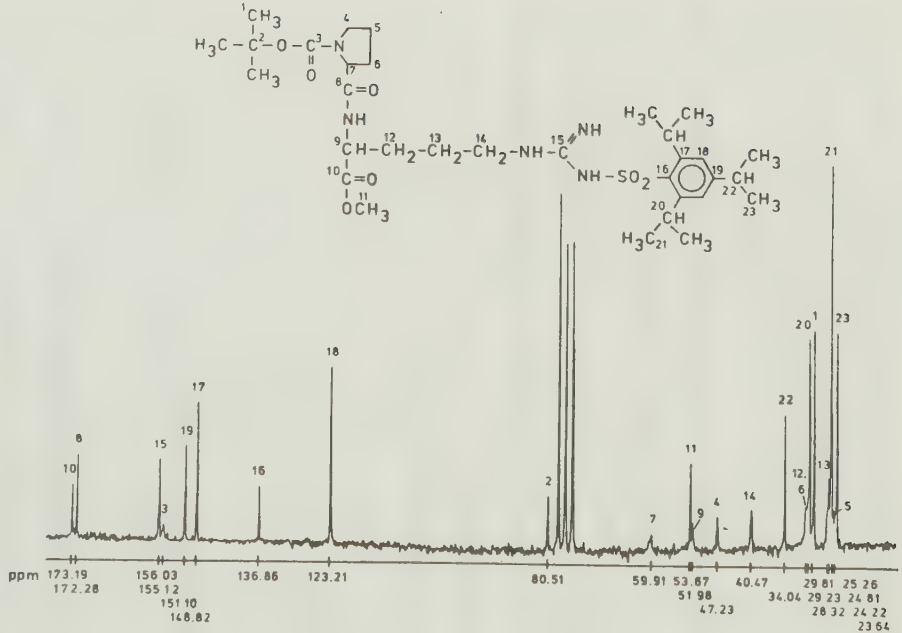


Abb. 93: ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Pro-Arg(TIP)-OMe, 150 mg in 1 ml $CDCl_3$, 22.63 MHz, protonenbreitbandentkoppelt, 40 000 Pulsinterferogramme

Ausbeute: 0.55 g (82.0 % d. Th.)

Rf_D: 0.2

Fp.: 113-115°C

$C_{27}H_{46}N_5O_5SCl$ (588.21)

N^{ε}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin (H-Lys(Z)-OH)

wird nach Literatur 222 dargestellt.

Ansatz: 36.5 g, 25 g Kupfersulfat, 38 ml Chlorameisensäurebenzylester.

Ausbeute: 57.3 g (95 % d. Th.) Lit: 85-90 %

Rf_A: 0.35

Fp.: 254-256° C Lit: 256-258° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +15.0 (c=2, 3 N HCl) Lit: +15±0.5 (c=2, 3 N HCl)

$C_{14}H_{20}N_2O_4$ (280.31)

N^{ε}-Benzyloxycarbonyl-L-lysinmethylester-hydrochlorid (H-Lys-OMe.HCl)

Ansatz: 7.0 g H-Lys(z)-OH, 15.2 ml BF_3-Etherat, 100 ml Methanol.

Ausbeute: 4.5 g (53.2 % d. Th.) Lit: [223] (58 %)

Rf_D:0.51

Fp.: 113° C Lit: 117-118° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +14.8 (c=2, H_2O) Lit: +15.5 (c=2, H_2O)

$C_{15}H_{23}N_2O_4Cl$ (330.81)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonyl-N^{ε}-benzyloxycarbonyl-L-lysinmethylester (BOC-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OMe)

3.09 g BOC-Thr(Bzl)-OH werden zusammen mit 1.35 g HOBt in 50 ml DMF gelöst und nach Kühlung auf -5^{o} C mit 2.06 g DCCI versetzt. Dann gibt man 3.3 g H-Lys(Z)-OMe.HCl und 1.2 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt den Ansatz zwei Stunden bei 0^{o} C und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffes wird das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen, der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Kristallisation erfolgt auf Petroletherzugabe.

Ausbeute: 4.56 g (77.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.68

Fp.: 100-101° C

$C_{31}H_{43}N_3O_8$ (585.70)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonyl-N^{ε}-benzyloxycarbonyl-L-lysin (BOC-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH)

4 g BOC-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OMe werden in 100 ml Methanol gelöst und mit 10 ml 1 N NaOH tropfenweise unter Rühren versetzt. Nach beendeter Verseifung wird unter Kühlung mit 1 N HCl neutralisiert und dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit 50 ml Wasser verdünnt, mit Essigester überschichtet und mit 2 N HCl auf pH 3 angesäuert. Die organische Phase wird abgetrennt und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat, erhält

man die Substanz auf Petroletherzugabe.

Ausbeute: 2.5 g (64.1 % d. Th.)

Rf_D: 0.43

Fp.: 68° C

$C_{30}H_{41}N_3O_8$ (571.67)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonyl-N^{ε}-benzyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-argininmethylester (BOC-Thr(Bzl)-Lys(Z)-Pro-Arg(TIP)-OMe)

0.44 g BOC-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH werden zusammen mit 0.1o4 g HOBt in 20 ml DMF gelöst, auf -5° C gekühlt und mit 0.159 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde gibt man 0.45 g H-Pro-Arg(TIP)-OMe.HCl und 0.08 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur. Dann wird wie üblich aufgearbeitet. Kristallisation aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 0.62 g (72.9 % d. Th.)

Rf_D: 0.60

Fp.: 90-91° C

$C_{57}H_{84}N_8O_{12}S$ (1105.41)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-threonyl-N^{ε}-benzyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginin (BOC-Thr(Bzl)-Lys(Z)-Pro-Arg(TIP)-OH)

0.5 g des geschützten Tetrapeptidmethylesters werden in 50 ml Methanol gelöst und mit 0.6 ml 1 N NaOH versetzt. Nach beendeter Verseifung wird mit 1 N HCl unter Kühlung neutralisiert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 20 ml Wasser verdünnt, mit Essigester überschichtet und mit 1 N HCl auf pH 3 angesäuert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Kristallisation erfolgt aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 0.41 g (83 % d. Th.)

Rf_D: 0.42

Fp.: 104-107° C

$C_{56}H_{82}N_8O_{12}S$ (1091.38)

L-Threonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-arginin-dihydroacetat (H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH.2 HAc)

0.3 g BOC-Thr(Bzl)-Lys(Z)-Pro-Arg(TIP)-OH werden in 10 ml flüssigem Fluorwasserstoff in einer Teflonapparatur in Gegenwart von 0.1 ml Anisol eine Stunde bei 0°C gerührt. Nach Entfernen des Fluorwasserstoffs nimmt man den Rückstand in 0.1 N Essigsäure auf, schüttelt dreimal mit Ether aus und behandelt dann die wäßrige Phase mit DOWEX 1X4-Anionenaustauscher (Acetatform). Nach Lyophilisation wird das Rohpeptid im ersten Reinigungsschritt durch Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose (Serva) unter Verwendung eines linearen Ammoniumacetatgradienten (0.0-0.4 M, pH 7.0) und im zweiten Reinigungsschritt an DOWEX W X 4 mit

einem Pyridinacetatgradienten (0.6-2.0; pH 4.2-6.1) gereinigt; entsalzung erfolgt an Sephadex G 15 mit Wasser als Elutionsmittel. Nach mehrmaliger Lyophilisation erhält man die Substanz als stark hygroskopisches Produkt.

Ausbeute: 30 mg (17.7 % d. Th.)

Rf: 0.15 (n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser: 15:10:3:12)

$\{\alpha\}_D^{20}$: -59.2 (c=1, 5 % HAc)

Aminosäureanalyse:	Thr	Lys	Pro	Arg
	0.96	1.03	0.95	1.0

$C_{25}H_{48}N_8O_{10}$ (620.71)

Benzotriazolyloxytris-(dimethylamino)phosphonium-hexafluorphosphat (BOP-Reagenz)

Die Verbindung wird nach Literatur 169 bzw. 170 hergestellt.

1. Verfahren:

Zu 50 ml einer 20 %igen Phosgenlösung in Toluol gibt man unter Rühren tropfenweise 18 g HMPT (Reaktionstemperatur: -5° C); nach zwei Stunden bei dieser Temperatur läßt man auf Raumtemperatur erwärmen und rührt dann über Nacht. Nach Entfernen des überschüssigen Phosgens sowie des Lösungsmittels im Vakuum, nimmt man den Rückstand in 30 ml absolutem Methylenchlorid auf und gibt nach vollständiger Auflösung 15.3 g HOBt-Hydrat hinzu, dann wird nach Kühlung auf -5°C, 10.1 g Triethylamin hinzugetropft und vier Stunden bei 0° C gerührt. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Triethylammoniumhydrochlorids entfernt man das Lösungsmittel im Vakuum und nimmt den Rückstand in 50 ml Wasser

auf und schüttelt die Wasserphase dreimal mit Ether aus. Die wäßrige Lösung des BOP-Chlorids wird dann unter Rühren in eine filtrierte Lösung von 20 g Kaliumhexafluorphosphat in 200 ml Wasser getropft. Das ausgefallene BOP-Reagenz wird mit Methylenchlorid extrahiert, die organische Phase mit wenig Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Substanz erhält man durch Etherfällung. Umkristallisiert wird aus Aceton/Ether.

Ausbeute: 28 g (63.3 % d. Th.)

Fp.: 140-142° C Lit: 147-149° C

$C_{12}H_{22}N_6OP_2F_6$ (442.3)

2. Verfahren:

18.64 g frisch destilliertes Phosphoroxichlorid wird in 100 ml Methylenchlorid gelöst und auf -5° C gekühlt, dann tropft man 21.48 g HMPT und 16.86 ml Triethylamin hinzu und rührt zwei Stunden bei 0° C. Dann wird der Ansatz auf Eiswasser gegeben, das mit 1.5 mol Äquivalenten Triethylamin abgepuffert ist; die wäßrige Phase wird zweimal mit Ether ausgeschüttelt und dann mit einem Moläquivalent Kaliumhexafluorphosphat gelöst in Wasser versetzt. Der Niederschlag wird abgesaugt, getrocknet und aus Aceton/Ether umkristallisiert.

Ausbeute: 20.5 g (42.0 % d. Th.)

Fp.: 140-142° C

In Anlehnung an diese Verfahren werden die folgenden Kupplungsreagenzien synthetisiert.

Succinimido-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorphosphat (SOP-Reagenz)

5.5 ml destilliertes Phosphoroxichlorid werden in 30 ml Methylenchlorid gelöst und nach Abkühlen auf -5° C unter Rühren tropfenweise so mit 10.4 ml HMPT und 4.2 ml Triethylamin versetzt, daß die Temperatur 0° nicht übersteigt. Nach erfolgter Zugabe, gibt man 9 g N-Hydroxysuccinimid sowie nochmals 4.2 ml Triethylamin hinzu. Nach zwei Stunden bei 0° C läßt man auf Raumtemperatur erwärmen und gibt dann das Ganze auf Eiswasser, das mit einem Äquivalent Triethylamin gepuffert ist. Nach Ausschütteln der wäßrigen Phase mit Ether, gibt man 11.5 g Kaliumhexafluorphosphat gelöst in Wasser hinzu. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt und im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Aceton/Ether.

Ausbeute: 10.47 g (46.6 % d. Th.)

Fp.: 132-133° C

$C_{10}H_{22}N_4O_3P_2F_6$ (422.25)

5-Norbornen-2.3-dicarbonsäureimido-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorphosphat (NOP-Reagenz)

In Analogie zum zuvor dargestellten SOP-Reagenz:

Ansatz: 9.23 g $POCl_3$, 10.74 g HMPT, 8.43 ml Triethylamin, sowie 10.75 g N-Hydroxy-5-Norbornen-2.3-dicarbonsäureimid

Ausbeute: 12.9 g (43.6 % d. Th.)

Fp.: 206-208° C $C_{15}H_{26}N_4O_3P_2F_6$ (486.33)

Phtalimido-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorphosphat(PhOP-Reagenz)

Ansatz: 5.5 ml $POCl_3$, 10.4 ml HMPT, 8.43 ml Triethylamin, 9.78 g N-Hydroxyphtalimid

Ausbeute: 13.3 g (47.5 % d. Th.)

Fp.:

$C_{14}H_{22}N_4O_3P_2F_6$ (470.29)

3-Hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin (HOOBt)

Die Verbindung wird nach Literatur 234 synthetisiert. Zu einer Lösung von 11.1 g o-Aminobenzolhydroxamsäure[235] in 340 ml Wasser und 20 ml konz. Salzsäure gibt man 55 ml einer 1.5 molaren Natriumnitritlösung. Bereits während der Zugabe derselben fällt das Produkt aus. Nach einer Stunde wird der Niederschlag abgesaugt, mit wenig Eiswasser gewaschen und über P_2O_5 getrocknet. Umkristallisiert wird aus Ethanol.

Ausbeute: 8.7 g (73.1 % d. Th.)

Fp.: 189° C Lit: 180-181° C

$C_7H_5N_3O_2$ (163.14)

4-Oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazino-3-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorphosphat (BOOP-Reagenz)

Synthese erfolgt analog SOP-Reagenz.

Ansatz: 2.75 ml $POCl_3$, 5.2 ml HMPT, 4.2 ml Triethylamin, 4.08 g HOOBt

Ausbeute: 5.73 g (48.7 % d. Th.)

Fp.: 146° C

$C_{13}H_{22}N_6O_2P_2F_6$ (470.3)

O-Benzotriazolyl-N.N-tetramethylharnstoff-hexafluorphosphat (HBTU-Reagenz)

Die Verbindung wird nach Literatur 179 synthetisiert. Zu 5.8 g Tetramethylharnstoff in 20 ml Toluol gibt man 30 ml einer 20 %igen Phosgenlösung in Toluol so daß die Temperatur -5° C nicht übersteigt. Nach beendeter CO_2-Entwicklung läßt man auf Raumtemperatur erwärmen und zieht dann das überschüssige Phosgen sowie das Lösungsmittel im Vakuum bei 25° C ab. Der Rückstand wird nach Waschen mit Ether in 50 ml Tetrahydrofuran suspendiert und mit 6 g HOBt versetzt. Es scheidet sich ein Öl ab, das nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum in 25 ml Methylenchlorid aufgenommen wird. Man gibt dann 9 g Kaliumhexafluorphosphat in Wasser dazu, filtriert den gebildeten Niederschlag ab und trocknet über P_2O_5, nachdem mit Wasser gewaschen wurde. Umkristallisation erfolgt aus Acetonitril.

Ausbeute: 11.75 g (62 % d. Th.)

Fp.: 250° C Lit: 254° C (Z.)

$C_{11}H_{16}N_5OPF_6$ (379.25)

O-(N-oxysuccinimido)-N.N'.tetramethyluronium-hexafluorphosphat (STU-Reagenz)

Die Arbeitsvorschrift wird in analogerweise wie für das zuvor beschriebene HBTU-Reagenz durchgeführt.

Ansatz: 11.51 g N-Hydroxysuccinimid, 11.6 g N.N.N'N'-Tetramethylharnstoff, 100 ml 20 %ige Phosgenlösung in Toluol, 36 g Kaliumhexafluorphosphat.

Ausbeute: 24 g (68 % d. Th.)

Fp.: 186-187° C

$C_9H_{16}N_3O_3PF_6$ (359.21)

O-(N-oxy-5-norbornen-2.3-dicarbonsäureimido)-N.N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat (NTU-Reagenz)

Ansatz: 5.8 g N.N.N'N'-Tetramethylharnstoff, 30 ml 20 %ige Phosgenlösung in Toluol, 8.95 g N-Hydroxy-5-norbornen-2.3-dicarbonsäureimid, 18 g Kaliumhexafluorphosphat

Ausbeute: 13.5 g (63.8 % d. Th.)

Fp.: 174-176° C

$C_{14}H_{20}N_3O_3PF_6$ (423.29)

O-(N-oxyphtalimido)-N.N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat (PhTU-Reagenz)

Ansatz: 9.28 g N.N.N'N'-Tetramethylharnstoff, 50 ml 20 % ige Phosgenlösung in Toluol, 13.04 g N-Hydroxyphtalimid, 15 g Kaliumhexafluorphosphat.

Ausbeute: 12.85 g (63.1 % d. Th.)

Fp.: 211° (Z.)

$C_{13}H_{16}N_3O_3PF_6$ (407.25)

(9-Fluorenyl)-methanol

Die Verbindung wird nach Literatur 224 synthetisiert. Zu 24 g Natriumhydrid (80 %ige Suspension in Paraffin) suspendiert in 500 ml absolutem Ether gibt man 41.5 g Fluoren sowie 45 ml frisch destillierten Ameisensäureethylester. Nach erfolgter Zugabe wird der Ansatz unter Rühren 10 Stunden am Rückfluß gehalten und nach erfolgter Abkühlung vorsichtig mit Eis versetzt bis die Gasentwicklung beendet ist. Der mit 500 ml Wasser verdünnte Ansatz wird sodann mit Petrolether ausgeschüttelt und von Ungelöstem abfiltriert. Unter Kühlung gibt man anschließend zur wäßrigen Phase 75 ml Essigsäure und extrahiert dann dreimal mit Methylenchlorid. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumhydrogencarbonatlösung (5 %) und Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird der ölige Rückstand in 500 ml absolutem Methanol aufgenommen und dann vorsichtig mit 10 g Natriumborhydrid versetzt. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur gibt man 1.5 l Wasser und anschließend 75 ml Essigsäure zum Ansatz und rührt weitere 1.5 Stunden. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, über P_2O_5 getrocknet und aus Petrolether (60-90° C) umkristallisiert.

Ausbeute: 41.6 g (85 % d. Th.)

Rf_D: 0.67

Fp.: 96° C Lit: 98.5-100.5

$C_{14}H_{12}O$ (196.25)

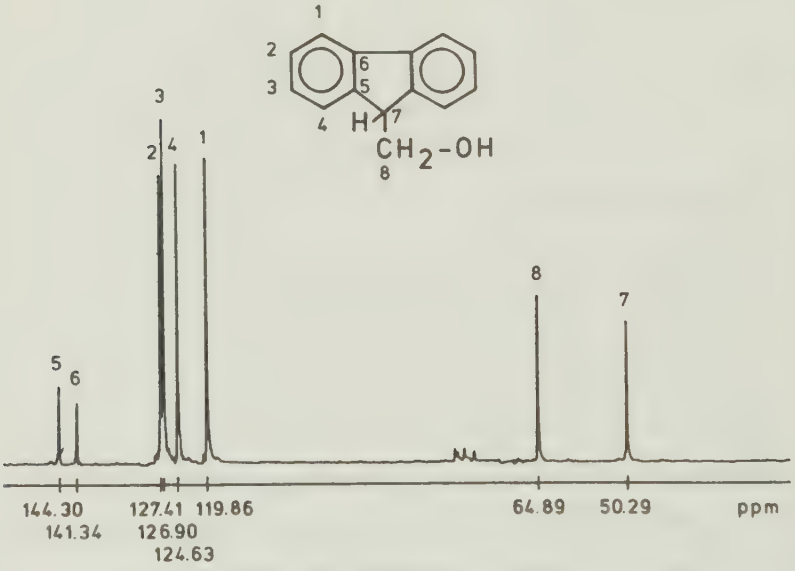


Abb. 94: ^{13}C-NMR-Spektrum von 9-Fluorenylmethanol, 22.63 MHz, 320 mg in 1ml $CDCl_3$, protonenbreitbandentkoppelt, 3000 Pulsinterferogramme

9-Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (FMOC-Cl)

Die Verbindung wird nach Literatur 225 synthetisiert. 14.25 g Phosgen gelöst in 150 ml Methylenchlorid werden auf -5° C gekühlt und unter Rühren mit 25.6 g 9-Fluorenylmethanol gelöst in 50 ml Methylenchlorid tropfenweise versetzt. Nach beendeter Zugabe rührt man fünf Stunden bei 0°

und über Nacht bei Raumtemperatur; dann entfernt man das überschüssige Phosgen und das Lösungsmittel im Vakuum und kristallisiert den Rückstand zweimal aus absolutem Ether um.

Ausbeute: 31 g (91.6 % d. Th.)

Rf_D: 0.69

Fp.: 62-64° C

$C_{15}H_{11}O_2Cl$ (258.70)

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-glycyl-glycin (FMOC-Gly-Gly-OH)

6.61 g Glycyl-glycin werden in 80 ml Wasser/30 ml Dioxan gelöst und mit 12.73 g Natriumcarbonat versetzt. Nach Kühlen auf 0° C gibt man unter Rühren 12.94 g FMOC-Cl gelöst in 30 ml Dioxan hinzu, rührt 4 Stunden bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur. Die so erhaltene Lösung wird nach Verdünnen mit 150 ml Wasser zweimal mit Ether ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wird nach Überschichten mit Essigester mit 3 N HCl auf pH 2 angesäuert. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels kristallisiert man den Rückstand aus Acetonitril um.

Ausbeute: 16.81 g (94.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.28

Fp.: 177-178° C

$C_{19}H_{18}N_2O_5$ (354.36)

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-phenylalanin (FMOC-Phe-OH)

8.26 g L-Phenylalanin werden in analoger Weise wie zuvor beschrieben mit 12.94 g FMOC-Cl und 12.72 g Natriumcarbonat als Base in Dioxan/Wasser umgesetzt. Kristallin erhält man die Substanz aus Essigester.

Ausbeute: 15.82 g (81.7 % d. Th.)

Rf_D: 0.45

Fp.: 177-179° C

$C_{24}H_{21}NO_4$ (387.44)

L-Leucin-tert.-butylester-hydrochlorid (H-Leu-OBut.HCl)

Die Verbindung wird nach Literatur 226 synthetisiert. 13.1 g L-Leucin werden in einer 1 l-Flasche in 100 ml Diethylenglycoldimethylether suspendiert, auf -10° C gekühlt, mit 250 ml flüssigem Isobuten sowie mit 10 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt und nach Verschließen der Flasche zwei Stunden bei 0° C und 36 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abkühlen auf 0° C wird dann der Inhalt unter Kühlen in überschüssige 2 N NaOH gegossen und das Produkt durch mehrmalige Extraktion mit Ether in die organische Phase überführt. Nach Neutralwaschen der vereinigten organischen Phasen mit Wasser, trocknet man über Magnesiumsulfat. Unter Kühlung gibt man dann die äquivalente Menge HCl-Gas, gelöst in Ether, hinzu, wobei das gewünschte Produkt ausfällt. Nach Absaugen und Trocknen über Calciumchlorid erhält man den Ester als weiße

Kristalle.

Ausbeute: 15.2 g (67.9 % d. Th.)

Rf_D: 0.56

Fp.: 163° C Lit: 166-167° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: 11.0 (c=2, EtOH) Lit: 12.4 (c=2, EtOH)

$C_{10}H_{22}NO_2Cl$ (223.74)

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-leucin-tert.-butylester (FMOC-Phe-Leu-OBut)

3.87 g FMOC-Phe-OH werden zusammen mit 2.23 g H-Leu-OBut. HCl in 50 ml DMF gelöst und auf -5° C gekühlt; dann gibt man 1.1 ml N-Methylmorpholin und 4.22 g SOP-Reagenz hinzu, rührt eine Stunde bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum, nimmt man den Rückstand in Essigester auf, und trocknet über Natriumsulfat, nachdem man mit $NaHCO_3$-Lösung, 1 N Citronensäure und Wasser gewaschen hat. Kristallisation erfolgt aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 3.8 g (68.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.80

Fp.: 148° C

$C_{34}H_{40}N_2O_5$ (556.70)

L-Phenylalanyl-L-leucin-tert.-butylester (H-Phe-Leu-OBut)

3.34 g FMOC-Phe-Leu-OBut werden in 50 ml frisch destilliertem Piperidin eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und

und dann in 250 ml Wasser gegossen. Nach Abfiltrieren des N-(9-Fluorenylmethyl)-piperidins, wird das Wasser im Vakuum entfernt. Der verbliebene Rückstand wird aus Stabilitätsgründen ohne weitere Charakterisierung direkt zur nächsten Kupplung eingesetzt.

Ausbeute: 2.5 g (74.7 % d. Th.)

$C_{19}H_{30}N_2O_3$ (334.46)

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin-tert.-butylester (FMOC-Gly-Gly-Phe-Leu-OBut)

2.28 g FMOC-Gly-Gly-OH und 2.18 g H-Phe-Leu-OBut werden in 50 ml DMF gelöst und mit 3.29 g BOP-Reagenz versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des DMF im Vakuum nimmt man den Rückstand in Essigester auf und trocknet über Natriumsulfat nachdem man wie üblich gewaschen hat. Kristallisation erfolgt aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 2.8 g (64.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.60

Fp.: 145-147° C

$C_{38}H_{46}N_4O_7$ (670.81)

Glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin-tert.-butylester (H-Gly-Gly-Phe-Leu-OBut)

In gleicherweise wie das Dipeptid werden 3.0 g des Tetra-

peptidesters von der FMOC-Schutzgruppe befreit.
Ausbeute: 1.16 g Öl (58.9 % d. Th.)
$C_{23}H_{36}N_4O_5$ (448.56)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin-tert.-butylester (BOC-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBut)

0.85 g BOC-Tyr(Bzl)-OH und 1.03 g H-Gly-Gly-Phe-Leu-OBut werden in 35 ml DMF gelöst und mit 0.97 g SOP-Reagenz versetzt. Nach 12 Stunden Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und nachdem der Rückstand in Essigester gelöst wurde, wie üblich gewaschen und getrocknet. Fällung erfolgt aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.
Ausbeute: 1.23 g (66.8 % d. Th.)
Rf_D: 0.64
Fp.: 115-118° C
$C_{44}H_{59}N_5O_9$ (801.98)

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH)

0.8 g BOC-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBut werden in einer Sakakibara-Apparatur nach Hinzufügen von 0.2 ml Anisol in 20 ml flüssigem, zuvor über Kobalttrifluorid getrocknetem, Fluorwasserstoff bei 0° C eine Stunde gerührt. Nach Entfernen des Fluorwasserstoffs wird kurz über

festem Kaliumhydroxid getrocknet und dann in 50 ml 2 %iger Essigsäure aufgenommen. Das Anisol wird durch Ausschütteln mit Ether entfernt, die wäßrige Phase mit DOWEX 1X4-Anionenaustauscher (Acetatform) behandelt und anschließend lyophilisiert. Das Rohpeptid wird durch Säulenchromatographie an Sephadex G 15 (Elutionsmittel: 20 %ige Essigsäure) gereinigt und ergibt in den Fließmitteln A und D einheitliche Dünnschichtchromatogramme.

Ausbeute: 308 mg (55.5 % d. Th.)

Rf_D: 0.16 Rf_A: 0.56

Fp.: 225° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +28.4 (c=1, MeOH)

Aminosäureanalyse:	Tyr	Gly	Phe	Leu
	0.96	2.0	0.99	1.0

4-Chlormethylpyridin (4-Picolylchlorid)

wird nach Vorschrift in Literatur 236 synthetisiert.
25 g 4-Pyridylcarbinol wird zu eiskaltem Thionylchlorid gegeben (heftige Reaktion!); der Ansatz wird nachdem sich alles gelöst hat, zwei Stunden am Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen gibt man 200 ml absolutes Benzol hinzu und filtriert den gebildeten Niederschlag ab. Nach Waschen mit wenig Benzol und Ether, trocknet man im Vakuum. Umkristallisiert wird aus absolutem Ethanol.

Ausbeute: 24.04 g (64 % d. Th.)

Fp.: 168° C Lit: 170-175° C

$C_6H_7NCl_2$ (164.04)

L-Methionin-4-picolylester-dihydrochlorid (H-Met-OPic.2 HCl)

Die Verbindung wird nach Literatur 187 synthetisiert. 14.92 g L-Methionin werden durch leichtes Erwärmen in 200 ml 0.5 N KOH in Methanol gelöst und nach tropfenweisem Versetzen mit 13.9 ml Acetessigester noch 15 min am Rückfluß gehalten; dann entfernt man das Lösungsmittel im Vakuum. Der verbliebene Rückstand wird im Ölpumpenvakuum über P_2O_5 getrocknet und dann in 100 ml absolutem DMF aufgenommen. Man gibt 16.5 g 4-Picolylchlorid gefolgt von 11.6 g N.N.N'N'-Tetramethylguanidin hinzu und rührt den Ansatz bei 90° C für zwei Stunden. Nach Abkühlen wird die so erhaltene,tiefrote Lösung mit Essigester mehrmals extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit $NaHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels wird der ölige Rückstand mit 200 ml 1 N HCl im Methanol versetzt und nach 10 min am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird aus Methanol/Ether kristallin erhalten.

Ausbeute: 29.4 g (93.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.51

Fp.: 167-169° C Lit: 169-170° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +5.0 (c=1, H_2O) Lit: +5.5 (c=1, H_2O)

$C_{11}H_{18}N_2O_2SCl_2$ (313.25)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-methionin-4-picolylester (BOC-Phe-Met-OPic)

3.98 g BOC-Phe-OH werden zusammen mit 4.69 g H-Met-OPic. 2 HCl in 50 ml Methylenchlorid, dem einige Tropfen DMF hinzugegeben werden, gelöst, mit 6.97 g SOP-Reagenz und 3.29 ml N-Methylmorpholin versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels nimmt man den Rückstand in Essigester auf und trocknet über Natriumsulfat nachdem man mit $NaHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen hat. Kristallisiert wird aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 3.21 g (43.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.63

Fp.: 113° C

$C_{25}H_{33}N_3O_5S$ (487.62)

Der gleiche Ansatz mit dem BOP-Reagenz ausgeführt, ergibt 4.32 g (59.01 % d. Th.), mit der DCCI/HOBt-Methode 4.5 g (61.47 % d. Th.)

L-Phenylalanyl-L-methionin-4-picolylester-dihydrochlorid (H-Phe-Met-OPic.2 HCl)

5 g BOC-Phe-Met-OPic werden mit 50 ml 1.2 N HCl/Essigsäure in Gegenwart von 0.5 ml Anisol eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Lösung tropft man in 250 ml eiskalten Ether. Der Niederschlag wird abgesaugt und über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 4.4 g (93.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.59

Fp.: 184° C

$C_{20}H_{27}N_3O_3SCl_2$ (460.42)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin-4-picolylester (BOC-Gly-Phe-Met-OPic)

1.7 g BOC-Gly-OH werden zusammen mit 4.36 g H-Phe-Met-OPic.2 HCl in 50 ml DMF gelöst, mit 4.73 g BOP-Reagenz sowie 2.14 ml N-Methylmorpholin versetzt und 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand nach Aufnehmen in Essigester wie üblich gewaschen und getrocknet. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Ether.

Ausbeute: 2.18 g (41.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.62

Fp.: 61-63° C

$C_{27}H_{36}N_4O_6S$ (544.67)

Glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin-4-picolylester-dihydrochlorid (H-Gly-Phe-Met-OPic.2 HCl)

1 g BOC-Gly-Phe-Met-OPic werden mit 30 ml 1.2 N HCl/Essigsäure in Gegenwart von 0.2 ml Anisol eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und dann in 150 ml eiskalten Ether gegossen. Die Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 0.8 g (84.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.50

Fp.: 176-178° C $C_{21}H_{30}N_4O_4SCl_2$ (517.48)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin-4-picolylester (BOC-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Met-OPic)

0.632 g BOC-Tyr(Bzl)-Gly-OH und 0.758 g H-Gly-Phe-Met-OPic 2 HCl werden in 30 ml DMF gelöst, mit 0.634 g SOP-Reagenz sowie 0.34 ml N-Methylmorpholin versetzt und 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum, nimmt man den Rückstand in Essigester auf und trocknet über Natriumsulfat nachdem man mit $NaHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen hat. Kristallisation erfolgt aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 0.81 g (63.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.58

Fp.: 155-156° C

$C_{45}H_{54}N_6O_9S$ (855.02)

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin-hydroacetat (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH.HAc)

0.5 g BOC-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Met-OPic werden in einer Teflonapparatur unter Zusatz von 0.1 ml Anisol und 0.1 ml Ethandithiol mit 10 ml flüssigem Fluorwasserstoff eine Stunde bei 0° C gerührt. Nach Entfernen des Fluorwasserstoffs wird der Rückstand in 0.1 N Essigsäure aufgenommen, 3 X mit Ether ausgeschüttelt und dann mit DOWEX 1 X4-Anionenaustauscher (Acetatform) behandelt und gefriergetrocknet. Das so erhaltene Rohpeptid wird in wenig Methanol

gelöst und mit 10 ml 1 N NaOH verseift. Nach beendeter Reaktion wird mit 1 N HCl neutralisiert und nach Entfernen des Methanols gefriergetrocknet. Dann wird wie folgt gereinigt: Säulenchromatographie an CM-Cellulose-Ionenaustauscher mit Ammoniumacetatgradient (0.01 - 0.3 M, pH 4.8 - 7.0) sowie Chromatographie an DEAE-Cellulose mit wäßrigem 1 %igem Pyridin/0.4 % Essigsäure-Puffer.

Ausbeute: 108 mg (28.7 % d. Th.)

Rf_D: 0.31 Rf_A: 0.42

Fp.: 200° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +26.4 (c=1, MeOH)

$C_{29}H_{39}N_5O_9S$ (633.72)

L-Phenylalanin-4-Picolylester-dihydrochlorid (H-Phe-OPic. 2HCl)

In Analogie zum Methionin-4-picolylester-dihydrochlorid werden 16.52 g L-Phenylalanin eingesetzt. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 23.7 g (72.0 % d. Th.)

Rf_D: 0.71

Fp.: 184-186° C Lit: 186-187° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: -13.6 (c=2, H_2O) Lit: -14.1 (c=2,H_2O)

$C_{15}H_{18}N_2O_2Cl_2$ (329.23)

N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-phenylalanin-4-picolylester (Z-Arg(TIP)-Phe-OPic)

5.75 g Z-Arg(TIP)-OH werden zusammen mit 3.29 g H-Phe-OPic. 2 HCl in 75 ml DMF gelöst und dann mit 4.86 g BOP-Reagenz und 2.2 ml N-Methylmorpholin versetzt. Nach 12 Stunden Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Kristallin erhält man das Produkt aus Methylenchlorid/Petrolether.

Ausbeute: 5.7 g (70.1 % d. Th.)

Rf_D: 0.66

Fp.: 107-109° C

$C_{44}H_{56}N_6O_7S$ (813.03)

N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-phenylalanin-4-picolylester-dihydrobromid (H-Arg(TIP)-Phe-OPic. 2 HBr)

4.5 g Z-Arg(TIP)-Phe-OPic werden in 50 ml 15 % HBr in Essigsäure 45 min bei Raumtemperatur gerührt, dann tropft man die Lösung unter Rühren in 200 ml eiskalten Ether. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit kaltem Ether gewaschen und im Vakuum über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisiert wird aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 4.22 g (90.7 % d. Th.)

Rf_D: 0.57

Fp.: 134° C

$C_{36}H_{52}N_6O_5SBr_2$ (840.73)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-methionyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-phenylalanin-4-picolylester (BOC-Phe-Met-Arg(TIP)-Phe-OPic)

1.89 g BOC-Phe-Met-OH werden mit 4 g H-Arg(TIP)-Phe-OPic. 2 HBr in 50 ml DMF gelöst und dann mit 2.43 g BOP-Reagenz sowie 1.1 ml N-Methylmorpholin versetzt. Nach 10 Stunden wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. In fester Form erhält man die Substanz aus Methylenchlorid/Petrolether.

Ausbeute: 4 g (79.3 % d. Th.)

Rf_D: 0.67

Fp.: 115° C (Z.)

$C_{55}H_{76}N_8O_9S$ (1057.39)

Ein Ansatz mit 1.24 g BOC-Phe-Met-OH, 2.83 g H-Arg(TIP)-Phe-OPic. 2 HBr sowie 0.69 ml N-Methylmorpholin in Gegenwart von HBTU-Reagenz ergibt eine Ausbeute von 1.68 g (50.9 % d. Th.)

L-Phenylalanyl-L-methionyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-phenylalanin-4-picolylester-dihydrochlorid (H-Phe-Met-Arg(TIP)-Phe-OPic.2 HCl)

5.16 g der BOC-Verbindung werden mit 75 ml 1.2 N HCl/Essigsäure übergossen und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Eintropfen in 200 ml eiskalten Ether saugt man den entstandenen Niederschlag ab und trocknet über festem Ka-

liumhydroxid. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 4.22 g (83.9 % d. Th.)

Rf_D:0.54

Fp.: 130-132° C

$C_{50}H_{70}N_8O_7S_2Cl_2$ (1030.19)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-phenylalanyl-4-picolylester (BOC-Gly-Phe-Met-Arg(TIP)-Phe-OPic)

0.71 g BOC-Gly-OH werden zusammen mit 4.18 g H-Phe-Met-Arg(TIP)-Phe-OPic.2 HCl in 50 ml DMF gelöst, mit 1.97 g BOP-Reagenz und 0.9 ml N-Methylmorpholin versetzt und 10 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird dann im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Kristallin erhält man die Substanz aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 3 g (66.5 % d. Th.)

Rf_D: 0.68

Fp.: 118-121° C (Z.)

$C_{57}H_{79}N_9O_{10}S_2$ (1114.44)

Glycyl-L-phenylalanyl-L-methionyl-N^{ω}-2.4.6-triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-phenylalanin-4-picolylesterdihydrochlorid (H-Gly-Phe-Met-Arg(TIP)-Phe-OPic.2 HCl)

2.8 g der BOC-Verbindung werden mit 50 ml 1.2 N HCl/Essig-

säure versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die so erhaltene Lösung wird dann unter Rühren in 150 ml eiskalten Ether getropft, der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit wenig kaltem Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 2.41 g (88.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.54

Fp.: 140-143° C (Z.)

$C_{52}H_{73}N_9O_8S_2Cl_2$ (1087.25)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionyl-N^{ω}-2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginyl-L-phenylalanin-4-picolylester (BOC-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Met-Arg(TIP)-Phe-OPic)

0.86 g BOC-Tyr(Bzl)-Gly-OH werden zusammen mit 2.17 g H-Gly-Phe-Met-Arg(TIP)-Phe-OPic.2 HCl in 35 ml DMF gelöst, mit 0.97 g BOP-Reagenz und 0.22 ml N-Methylmorpholin versetzt und 10 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, nimmt man den Rückstand in Essigester auf, wäscht mit Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser und trocknet dann über Natriumsulfat. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 2.03 g (71.2 % d. Th.)

Rf_D:0.60

Fp.: 154-156° C

$C_{75}H_{97}N_{11}O_{13}S_2$ (1424.79)

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionyl-L-arginyl-phenylalanin-dihydroacetat (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe-OH.2 HAc)

1.5 g des geschützten Heptapeptidesters werden mit 0.25 ml Ethandithiol versetzt und dann in einer Teflonapparatur mit 20 ml flüssigem, zuvor über Kobalttrifluorid getrocknetem, Fluorwasserstoff eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Fluorwasserstoffs wird der Rückstand kurz über festem Kaliumhydroxid getrocknet und dann in 0.1 N Essigsäure aufgenommen. Nachdem dreimal mit Ether ausgeschüttelt wurde, behandelt man die essigsaure Lösung mit DOWEX 1X4-Anionenaustauscher (Acetatform) und lyophilisiert nach Abfiltrieren des Austauschers. Das so erhaltene Ropeptid wird in wenig Methanol gelöst und mit 20 ml 1 N NaOH tropfenweise versetzt. Nach beendeter Verseifung neutralisiert man mit 1 N HCl und entfernt das Methanol am Rotationsverdampfer. Nach Gefriertrocknung der Wasserphase wird die erhaltene Substanz durch Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose (Säule: 1.6 x 70 cm) mit Hilfe eines Ammoniumacetatgradienten (pH 4.8-7.0; 0.01-0.3 M) von letzten Verunreinigungen befreit und anschließend mehrfach lyophilisiert.

Ausbeute: 0.62 g (59.6 % d. Th.)

Rf_A: 0.37

Fp.: >230° C

$C_{46}H_{57}N_{10}O_{13}S$ (990.08)

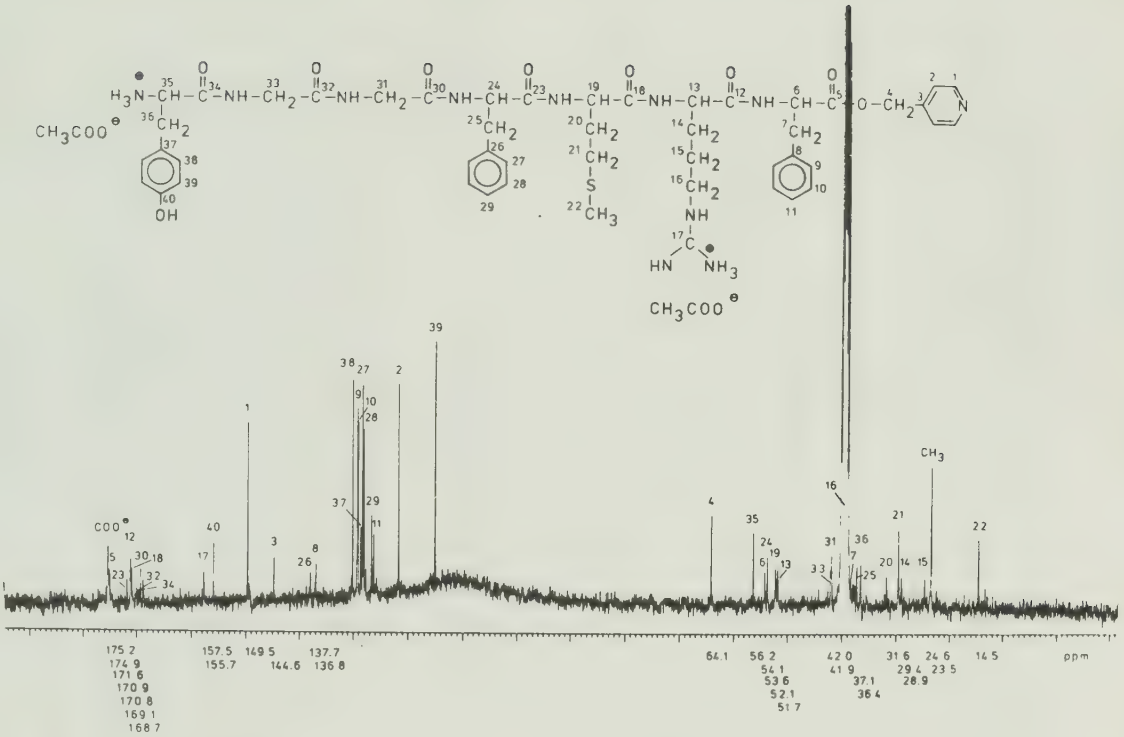


Abb. 95: ^{13}C-NMR-Spektrum von H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe-OPic.2 HAc, 100 mg in 1 ml DMSO-d_6, 100 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

L-Methioninmethylester-hydrochlorid (H-Met-OMe.HCl)

Die Verbindung wird nach der Thionylchlorid-Methode dargestellt. Ansatz: 11.39 g L-Methionin, 10.71 g Thionylchlorid, 105 ml Methanol. Umkristallisation aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 13.05 g (84.3 % d. Th.)

Rf_D: 0.63

Fp.: 148-150° C Lit: 145-146° C[227]

$\{\alpha\}_D^{20}$: +26.4 (c=5, H_2O) Lit: +26.8 (c=5, H_2O)

$C_6H_{14}NO_2SCl$ (199.7)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-methioninmethylester (BOC-Phe-Met-OMe)

6.62 g BOC-Phe-OH werden zusammen mit 2.78 g N-Hyroxysuccinimid in 60 ml DMF gelöst und auf -5° C gekühlt. Dann gibt man 6.13 g DCCI hinzu rührt eine Stunde bei 0° C und gibt dann 5.5 g H-Met-OMe.HCl und 3.03 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° C und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und dann wie üblich gewaschen und getrocknet. Kristallisiert wird aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 7.9 g (77.1 % d. Th.)

Fp.: 81-84° C

Rf_D: 0.71

$\{\alpha\}_D^{20}$: -22.1 (c=1, MeOH) $C_{20}H_{30}N_2O_5S$ (410.53)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-methioninamid (BOC-Phe-Met-NH_2)

7.2 g BOC-Phe-Met-OMe werden in 150 ml absolutem Methanol gelöst, auf -10° C gekühlt und dann bis zur Sättigung mit gasförmigem Ammoniak versetzt. Man rührt den Ansatz fünf Stunden bei 0° C und 20 Stunden bei Raumtemperatur und zieht nach beendeter Umsetzung das Lösungsmittel im Vakuum ab. Der Rückstand wird aus Methylenchlorid/Methanol/Ether kristallin erhalten.

Ausbeute: 6 g (86.4 % d. Th.)

Rf_D: 0.61

Fp.: 183° C

$C_{19}H_{29}N_3O_4S$ (395.52)

L-Phenylalanyl-L-methioninamid-hydrochlorid (H-Phe-Met-NH_2. HCl)

6.84 g BOC-Phe-Met-NH_2 werden nach Zugabe von 0.2 ml Ethandithiol mit 75 ml 1.2 N HCl/Essigsäure versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die so erhaltene Lösung wird unter Rühren in 200 ml eiskalten Ether getropft. Der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit wenig kaltem Ether gewaschen und über Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisiert wird aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 5.5 g (95.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.43

Fp.: 202° C $C_{14}H_{22}N_3O_2SCl$ (331.87)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-D-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-methioninamid (BOC-D-Tyr(Bzl)-Phe-Met-NH_2)

2.9 g BOC-D-Tyr(Bzl)-OH werden zusammen mit 0.9 g N-Hydroxysuccinimid in 50 ml DMF gelöst, auf -5° C gekühlt und dann mit 1.61 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde bei 0°C fügt man 2.59 g H-Phe-Met-NH_2.HCl und 0.86 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur und filtriert dann den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum, nimmt man den Rückstand in Essigester auf und trocknet über Natriumsulfat, nachdem man wie üblich gewaschen hat. Die Substanz erhält man aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 3.92 g (77.3 % d. Th.)

Rf_D: 0.64

Fp.: 187° C

$C_{35}H_{44}N_4O_6S$ (648.82)

D-O-Benzyl-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-methioninamid-hydrochlorid (H-D-Tyr(Bzl)-Phe-Met-NH_2.HCl)

3.5 g BOC-Verbindung werden nach Zugabe von 0.1 ml Anisol mit 50 ml 1.2 N HCl/Essigsäure versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach üblicher Aufarbeitung wird aus Methanol/Ether umkristallisiert.

Ausbeute: 2.9 g (91.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.51

Fp.: 225° C (Z.)

$C_{30}H_{37}N_4O_4SCl$ (585.17)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-2.6-Dichlorbenzyl-L-tyrosyl-L-alanyl-O-benzyl-D-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-methionin-amid (BOC-Tyr(DCB)-Ala-D-Tyr(Bzl)-Phe-Met-NH_2)

2.18 g BOC-Tyr(DCB)-Ala-OH und 0.49 g N-Hydroxysuccinimid werden in 35 ml DMF gelöst, auf -5° C gekühlt und dann mit 0.88 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde fügt man 2.5 g H-D-Tyr(Bzl)-Phe-Met-NH_2.HCl und 0.47 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° C und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffes, entfernt man das Lösungsmittel im Vakuum und nimmt den Rückstand in Essigester auf. Nach üblicher Waschprozedur wird über Natriumsulfat getrocknet. Kristallisiert wird aus DMF/Ether.

Ausbeute: 3.5 g (78.8 % d. Th.)

Rf_D: 0.69

Fp.: 193-195° C

$C_{54}H_{62}N_6O_9SCl_2$ (1042.09)

L-tyrosyl-L-alanyl-D-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-methionin-amid-hydroacetat (H-Tyr-Ala-D-Tyr-Phe-Met-NH_2.HAc)

1 g des geschützten Pentapeptidamids wird unter Zusatz von 0.2 ml Ethandithiol in einer Teflonapparatur mit 20 ml flüssigem Fluorwasserstoff eine Stunde bei 0° C gerührt.

Nach Entfernen des Fluorwasserstoffs, wird der Rückstand in 0.1 N Essigsäure aufgenommen, dreimal mit Ether ausgeschüttelt und dann mit DOWEX 1X4-Anionenaustauscher behandelt und nach Abfiltrieren deselben, gefriergetrocknet. Das Rohpeptid wird durch Verteilungschromatographie an einer Säule (2.5 X 100 cm), die mit Kieselgel Si 60 (0.040-0.063 mm; Merck) gefüllt ist, mit dem Elutionsmittelsystem Toluol/Chloroform/Methanol/Wasser (40:40:40:5) gereinigt.

Ausbeute: 0.45 g (62.5 % d. Th.)

Rf_A: 0.54

Fp.: 185-187° C

Aminosäureanalyse:	Tyr	Ala	Phe	Met
	2.06	0.96	1.01	1.0

$C_{37}H_{48}N_6O_9S$ (752.89)

N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methioninamid (FMOC-Gly-Gly-Phe-Met-NH_2)

1.39 g FMOC-Gly-Gly-OH werden zusammen mit 0.45 g N-Hydroxysuccinimid in 35 ml DMF gelöst, auf -5° C gekühlt und dann mit 0.81 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde bei 0° C gibt man 1.3 g H-Phe-Met-NH_2.HCl und 0.43 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° C und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Nach üblicher Aufarbeitung kristallisiert man die Substanz aus DMF/Ether.

Ausbeute: 1.89 g (76.2 % d. Th.)

Rf_D:0.63

Fp.: 168° C

$C_{33}H_{37}N_5O_6S$ (631.75)

Glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methioninamid-hydrochlorid (H-Gly-Gly-Phe-Met-NH_2.HCl)

1.65 g FMOC-Gly-Gly-Phe-Met-NH_2 werden mit 40 ml frisch destilliertem Piperidin eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und dann in 100 ml Eiswasser gegeben. Nach Abfiltrieren des Fluorenylpiperidins wird das Filtrat am Rotationsverdampfer bei 35° C zur Trockene gebracht. Der Rückstand wird nach Versetzen mit 30 ml 1.2 N HCl/Essigsäure durch Etherzugabe zur Ausfällung gebracht. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 0.96 g (82.7 % d. Th.)

Rf_D: 0.11

Fp.: 164-167° C

$C_{18}H_{28}N_5O_4SCl$ (445.97)

N-Benzyloxycarbonyl-sarcosin (Z-Sar-OH)

Die Verbindung wird nach Literatur 229 synthetisiert. 17.82 g Sarcosin werden in 100 ml 2 N Natronlauge gelöst und auf 0° C gekühlt und durch simultanes Zutropfen von 35 ml Chlorameisensäurebenzylester und 50 ml 4 N NaOH unter Rühren zur Umsetzung gebracht. Nach zwei Stunden bei 0° C und vier Stunden bei Raumtemperatur wird die

Lösung zweimal mit Ether ausgeschüttelt, die wäßrige Phase mit Essigester überschichtet und unter Kühlung mit 4 N HCl auf pH 2 angesäuert. Die organische Phase wird mit Wasser neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels verbleibt die Substanz als Öl.

Ausbeute: 39.4 g (88.2 % d. Th.)

Rf_D: 0.52 Rf_A: 0.67

$C_{11}H_{13}NO_4$ (223.23)

N-Benzyloxycarbonyl-sarcosin-pentachlorphenylester (Z-Sar-OPCP)

22.68 g Z-Sar-OH werden in 200 ml absolutem Methylenchlorid gelöst und auf -5° C gekühlt. Dann gibt man 27.06 g Pentachlorphenol und 20.93 g DCCI hinzu, rührt zwei Stunden bei 0° C und über Nacht bei Raumtemperatur und filtriert dann vom Dicyclohexylharnstoff ab. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, kristallisiert man zweimal aus Isopropanol um.

Ausbeute: 40.0 g (84 % d. Th.)

Rf_D: 0.85 Rf_A: 0.87

Fp.: 102° C

$C_{17}H_{12}NO_4Cl_5$ (471.38)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-2.6-Dichlorbenzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methioninamid (BOC-Tyr(DCB)-Gly-Gly-Phe-Met-NH_2)

1.1 g BOC-Tyr(DCB)-OH werden zusammen mit 0.29 g N-Hydroxysuccinimid in 35 ml DMF gelöst, auf -5° C gekühlt und dann mit 0.52 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde bei 0° C gibt man 1.11 g H-Gly-Gly-Phe-Met-NH_2.HCl und 0.26 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° C und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Nach üblicher Aufarbeitung wird aus DMF/Ether kristallisiert.

Ausbeute: 1.21 g (58.1 % d. Th.)

Rf_D: 0.60

Fp.: 178° C

$C_{39}H_{48}N_6O_8SCl_2$ (831.82)

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methioninamid-hydroacetat (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-NH_2.HAc)

0.5 g des geschützten Pentapeptidamids wird wie oben beschrieben durch Fluorwasserstoffbehandlung von den Schutzgruppen befreit. Nach Gefriertrocknung wird das Rohpeptid durch Verteilungschromatographie an Kieselgel Si 60 (Merck) mit dem Elutionsmittelsystem Toluol/Chloroform/Methanol/Wasser (40:40:40:5) gereinigt.

Ausbeute: 190 mg (50.0 % d. Th.)

Rf_A: 0.49

Fp.: 125° C

Aminosäureanalyse:	Tyr	Gly	Phe	Met
	1.0	1.93	1.01	0.96

$C_{29}H_{40}N_6O_8S$ (632.74)

N-Benzyloxycarbonyl-sarcosyl-L-phenylalanyl-L-methioninamid (Z-Sar-Phe-Met-NH_2)

1.85 g Z-Sar-OPCP und 1.3 g H-Phe-Met-NH_2.HCl werden in 40 ml absolutem DMF gelöst und mit 0.43 ml N-Methylmorpholin sowie einer Spatelspitze HOBt als Katalysator versetzt. Nach 24-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 1.7 g (86.7 % d. Th.)

Rf_D: 0.70

Fp.: 164° C

$C_{25}H_{32}N_4O_5S$ (500.62)

Sarcosyl-L-phenylalanyl-L-methioninamid-hydrobromid (H-Sar-Phe-Met-NH_2.HBr)

1.55 g Z-Sar-Phe-Met-NH_2 werden mit 40 ml 33 % HBr/Essigsäure übergossen und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Lösung wird unter Rühren in 150 ml eiskalten Ether getropft, der gebildete Niederschlag wird abgesaugt, mit wenig kaltem Ether gewaschen und über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 1.2 g (86.6 % d. Th.)

Rf_D: 0.26

Fp.: 117° C

$C_{17}H_{27}N_4O_3SBr$ (447.40)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-sarcosyl-L-phenylalanyl-L-methioninamid (BOC-Gly-Sar-Phe-Met-NH_2)

0.55 g BOC-Gly-OH werden zusammen mit 0.36 g N-Hydroxysuccinimid in 35 ml DMF gelöst, auf -5° C gekühlt und dann mit 0.65 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde bei 0° C gibt man 1.4 g H-Sar-Phe-Met-NH_2.HBr und 0.34 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° C und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abtrennen des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffs wird wie üblich verfahren. Kristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 0.95 g (57.9 % d. Th.)

Rf_D: 0.54

Fp.: 138° C

$C_{24}H_{37}N_5O_6S$ (523.65)

Glycyl-sarcosyl-L-phenylalanyl-methioninamid-hydrochlorid (H-Gly-Sar-Phe-Met-NH_2.HCl)

0.65 g BOC-Gly-Sar-Phe-Met-NH_2 werden mit 30 ml 1.2 N HCl/Essigsäure und 0.15 ml Ethandithiol versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach erfolgter Etherfällung wird der Niederschlag abgesaugt und über Kalium-

hydroxid getrocknet. Umkristallisiert wird aus Methanol/ Ether.

Ausbeute: 0.5 g (87.7 % d. Th.)

Rf_D: 0.23

Fp.: 157° C

$C_{19}H_{30}N_5O_4SCl$ (460.0)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-2.6-Dichlorbenzyl-L-tyrosyl-glycyl-sarcosyl-L-phenylalanyl-L-methioninamid (BOC-Tyr(DCB)-Gly-Sar-Phe-Met-NH_2)

0.44 g BOC-Tyr(DCB)-OH werden zusammen mit 0.12 g N-Hydroxy-succinimid in 25 ml DMF gelöst, auf -5° C gekühlt und dann mit 0.2 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde bei 0° C fügt man 0.46 g H-Gly-Sar-Phe-Met-NH_2.HCl und 0.12 ml N-Methyl-morpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Nach üblicher Aufarbeitung wird aus DMF/Ether kristallisiert.

Ausbeute: 0.5 g (65.09 % d. Th.)

Rf_D: 0.64

Fp.: 169-171° C

$C_{40}H_{50}N_6O_8SCl_2$ (845.84)

L-Tyrosyl-glycyl-sarcosyl-L-phenylalanyl-L-methioninamid-hydroacetat (H-Tyr-Gly-Sar-Phe-Met-NH_2.HAc)

0.3 g BOC-Tyr(DCB)-Gly-Sar-Phe-Met-NH_2 werden in einer Teflonapparatur mit 0.15 ml Ethandithiol versetzt und

dann mit 15 ml, zuvor über Kobalttrifluorid getrocknetem, Fluorwasserstoff eine Stunde bei 0° C gerührt. Nach Entfernen des Fluorwasserstoffs wird wie zuvor beschrieben aufgearbeitet. Das so gewonnene Rohpeptid wird durch Verteilungschromatographie an Kieselgel Si 60 (Merck) mit dem Elutionsmittelsystem: Toluol/Chloroform/Methanol/Wasser (40:40:40:5) von letzten Verunreinigungen befreit. Kristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 70 mg (30.4 % d. Th.)

Rf_A: 0.45

Fp.: 141-143° C

Aminosäureanalyse:	Tyr	Gly	Sar	Phe	Met
	0.99	1.04	1.0	1.0	0.94

$C_{30}H_{42}N_6O_8S$ (646.76)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycinmethylester (BOC-Tyr(Bzl)-Gly-OMe)

11.13 g BOC-Tyr(Bzl)-OH werden zusammen mit 3.77 g H-Gly-OMe.HCl in 100 ml DMF gelöst und auf -5° C gekühlt, dann gibt man 9.07 g DPPA und 7.26 ml Triethylamin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° C und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Filtration wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und wie üblich gewaschen und getrocknet. Kristallisation erfolgt aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 10.4 g (78.4 % d. Th.)

Rf_D: 0.81

Fp.: 119-120° C

$C_{24}H_{30}N_2O_6$ (442.51)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycin (BOC-Tyr(Bzl)-Gly-OH)

9.64 g BOC-Tyr(Bzl)-Gly-OMe werden in 100 ml Methanol gelöst, mit einigen Tropfen Wasser versetzt und unter Rühren tropfenweise mit 15 ml 3 N NaOH verseift. Nach beendeter Reaktion (DC), wird unter Kühlung mit 3 N HCl neutralisiert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und dann der Rückstand mit 100 ml Wasser versetzt. Durch Überschichten mit Essigester und Ansäuern auf pH 3 mit fester Citronensäure wird die Substanz in die organische Phase transportiert, die man mit Wasser neutral wäscht und dann über Natriumsulfat trocknet. Kristallisiert wird aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 7.8 g (83.6 % d. Th.)

Rf_D: 0.39

Fp.: 149-151° C

$C_{23}H_{28}N_2O_6$ (428.49)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-2.6-Dichlorbenzyl-L-tyrosyl-L-alaninmethylester (BOC-Tyr(DCB)-Ala-OMe)

8.8 g BOC-Tyr(DCB)-OH werden zusammen mit 2.3 g N-Hydroxysuccinimid in 75 ml Methylenchlorid gelöst, auf -5° C gekühlt und dann mit 4.12 g DCCI versetzt. Nach einer Stunde

gibt man 2.8 g H-Ala-OMe.HCl und 2.2 ml N-Methylmorpholin hinzu, rührt weitere zwei Stunden bei 0° C und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Nach üblicher Aufarbeitung, kristallisiert man aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 7.2 g (68.5 % d. Th.)

Rf_D: 0.76

Fp.: 125-127° C

$C_{25}H_{30}N_2O_6Cl_2$ (525.43)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-2.6-Dichlorbenzyl-L-tyrosyl-L-alanin (BOC-Tyr(DCB)-Ala-OH)

6.4 g BOC-Tyr(DCB)-Ala-OMe werden in 150 ml Dioxan/Wasser (4:1) gelöst und unter Rühren tropfenweise mit 18 ml 1 N NaOH versetzt. Nach beendeter Verseifung wird unter Kühlung mit 1 N HCl neutralisiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels, gibt man 50 ml Wasser hinzu, überschichtet mit Essigester und säuert mit fester Citronensäure auf pH 3 an. Nach Abtrennen der organischen Phase, wird die wäßrige Phase noch zweimal mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigesterphasen werden mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Substanz erhält man in fester Form aus Methylenchlorid/Ether.

Ausbeute: 6.02 g (96.6 % d. Th.)

Rf_D: 0.43

Fp.: 103-105° C

$C_{24}H_{28}N_2O_6Cl_2$ (511.40)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanin-N-hydroxysuccinimidester (BOC-Phe-OSu)

Die Verbindung wird nach Literatur 230 synthetisiert.
Ansatz: 5.3 g BOC-Phe-OH, 2.3 g N-Hydroxysuccinimid, 2.06 g DCCI in Methylenchlorid.
Ausbeute: 5.65 g (78 % d. Th.)
Rf_D: 0.61
Fp.: 151-153° C Lit: 152-153° C
$\{\alpha\}_D^{20}$: -19.5 (c=1, Dioxan)
$C_{18}H_{22}N_2O_6$ (362.38)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-methionin (BOC-Phe-Met-OH)

Die Verbindung wird analog Referenz 231 synthetisiert.
Ansatz: 3.62 g BOC-Phe-OSu, 1.71 g Methionin-Natriumsalz, in DMF.
Ausbeute: 2.85 g (72.0 % d. Th.)
Rf_D: 0.45
Fp.: 143-145° C Lit: 138-140° C
$\{\alpha\}_D^{20}$: -8.2 (c=1, DMF) Lit: -9.8 (c=1, DMF)
$C_{19}H_{28}N_2O_5S$ (396.51)

L-Alaninmethylester-hydrochlorid (H-Ala-OMe.HCl)

Die Verbindung wird nach Referenz 232 synthetisiert.

Ansatz: 17.8 g L-Alanin, 26.2 g Thionylchlorid, 60 ml Methanol. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 26.1 g (93.5 % d. Th.)

Rf_D: 0.32

Fp.: 108-109° C Lit: 109-111° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +9.0 (c=2, MeOH) Lit: $\{\alpha\}_D^{22}$: +6.5 (c=1.6, MeOH)

$C_4H_{10}NO_2Cl$ (139.58)

O-Benzyl-L-serinmethylester-hydrochlorid (H-Ser(Bzl)-OMe. HCl)

Die Verbindung wird nach Literatur 233 nach der Thionylchloridmethode synthetisiert.

Ansatz: 3 g O-Benzyl-L-serin, 1.33 ml Thionylchlorid, 25 ml Methanol. Umkristallisation erfolgt aus Methanol/Ether.

Ausbeute: 3.3 g (87.3 % d. Th.)

Rf_D: 0.65

Fp.: 143-145° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +6.5 (c=1, MeOH)

$C_{11}H_{16}NO_3Cl$ (245.71)

O-2.6-Dichlorbenzyl-L-tyrosin (H-Tyr(DCB)-OH)

Die Verbindung wird nach Literatur 194 synthetisiert.

Ansatz: 10.4 g L-tyrosin, 56 ml 2 N NaOH, 6.8 g Kupfersulfat-pentahydrat in 28 ml Wasser, 18 g 2.6-Dichlorbenzylbromid. Umkristallisation erfolgt aus 50 %igem

Ethanol.

Ausbeute: 7.4 g (39.3 % d. Th.)

Rf_A: 0.68

Fp.: 194-196° C Lit: 200-203° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: -9.5 (c=2, 80 % HAc) Lit: -10.6 (c=2, 80 % HAc)

$C_{16}H_{15}NO_3Cl_2$ (340.22)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-2.6-Dichlorbenzyl-L-tyrosin (BOC-Tyr(DCB)-OH)

Analog Referenz 194 werden 7 g H-Tyr(DCB)-OH mit 3.25 g BOC-Azid nach der Schnabel-Methode umgesetzt. Kristallisation des Produkts erfolgt aus Ether/Petrolether.

Ausbeute: 6.8 g (75 % d. Th.)

Rf_D: 0.55

Fp.: 109-111° C

$\{\alpha\}_D^{20}$: +19.8 (c=2, EtOH)

$C_{21}H_{23}NO_5Cl_2$ (440.34)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tryptophan-2.4.5-trichlorphenylester (BOC-Trp-OCP)

Nach Vorschrift 217 werden 3.04 g L-tryptophan und 1.97 g 2.4.5-Trichlorphenol in 60 ml Methylenchlorid gelöst, auf -5° C gekühlt und dann mit 2.06 g DCCI versetzt. Man Rührt den Ansatz zwei Stunden bei 0° C und dann über Nacht bei Raumtemperatur. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff

wird abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand aus Methylenchlorid/Ether/Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 4 g (82.6 % d. Th.)

Rf_D: 0.74

Fp.: 131-132° C Lit: 134.5-135° C

$C_{22}H_{21}N_2O_4Cl_3$ (483.78)

Chlor-bis(dimethylamino)phosphoroxid

Diese Verbindung wird nach Literatur 248 synthetisiert.

Ansatz: 187 g Dimethylamin gelöst in 500 ml abs. Ether. 155 g Phosphoroxichlorid in 1000 ml Ether bei 0° C

Ausbeute: 120 g (69.7 % d. Th.)

Kp.: 57°/4 mm Lit: 97°C/6 mm

Pentamethylphosphorsäuretrisamid (PMPT)

wird entsprechend Literatur 249 hergestellt.

Ansatz: 15.3 g Methylamin in 170 ml absolutem Benzol und 36.3 g Chlor-bis(dimethylamino)phosphoroxid bei 5° C.

Ausbeute: 18.41 g (52 % d. Th.)

Kp.: 98° C/o.o5 mm

Trimethylharnstoff

30 g Methylamin werden in 400 ml absolutem Benzol gelöst, dann tropft man unter Rühren bei 5° C 26.85 g Dimethylcarbaminsäurechlorid (BASF) langsam hinzu, rührt noch

30 Minuten bei 5° C und läßt dann auf Raumtemperatur erwärmen. Um die Reaktion zu beenden, wird der Ansatz anschließend eine halbe Stunde am Rückfluß erwärmt und nach Abkühlen vom ausgefallenen Methylaminhydrochlorid abfiltriert. Nach Abziehen des Benzols wird aus Ether umkristallisiert.

Ausbeute: 20.0 g (74 % d. Th.)

Rf_D: 0.48 Fp.: 71° C

$C_4H_{10}N_2O$ (102.13)

Polymeres "HMPT"

Dieses wird in Anlehnung an Literatur 247 hergestellt. 2.49 g Natriumhydridsuspension (80 %) werden unter Stickstoff in 85 ml Benzol gelöst, dann gibt man unter Rühren 12.12 g Pentamethylphosphorsäuretrisamid hinzu und erhitzt das Ganze unter Stickstoff 15 Stunden am Rückfluß. Die erhaltene Lösung wird tropfenweise zu 10 g Merrifield-Harz, das mit 5 mmol/g Harz (Fluka) beladen ist, gegeben und 6 Stunden am Rückfluß erhitzt. Das Harz wird in einer Stickstoffritte abgenutscht, mit absolutem THF, THF/Wasser und Methylenchlorid gewaschen und bei 60° C im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 14.1 g (79.7 % d. Th.), d.h. 0.473 mmol HMPT/g Harz bzw. 0.772 g HMPT/g Harz = Beladungsgrad 94.9 % nach dem Chlorwert von 0.92 % der Elementaranalyse.

Polymerer "Tetramethylharnstoff"

2.49 g Natriumhydridsuspension oder die äquivalente Menge

n-Butyl-Lithium in Benzol werden analog der oberen Vorschrift mit 7.47 g Trimethylharnstoff, 10 g Merrifield-Harz umgesetzt.

Ausbeute: 12.1 g (83.5 % d. Th.), d.h. 0.448 g TMU/g Harz
Beladungsgrad: 88.8 %, berechnet aus dem Chlorwert von 1.98 % der Elementaranalyse

Polymeres "BOP"- bzw. "SOP"-Reagenz sowie Polymers "HBTU"- bzw. "SBTU"-Reagenz

5 g Polymers "HMPT" bzw. 5 g polymerer "Tetramethylharnstoff" werden in 25 ml absolutem Toluol suspendiert und unter Kühlung mit 10 ml einer 20 %igen Phosgenlösung versetzt. Man rührt über Nacht bei Raumtemperatur und zieht dann das Lösungsmittel sowie überschüssiges Phosgen ab. Nach Suspension in 50 ml Methylenchlorid gibt man 3.6 g HOBt bzw. 2.3 g N-Hydroxysuccinimid und die äquivalente Menge Triethylamin hinzu, rührt drei Stunden bei Raumtemperatur und filtriert dann das Harz ab. Nach Waschen mit Methylenchlorid, Methylenchlorid/DMF und Ether wird im Ölpumpenvakuum über Calciumchlorid getrocknet.

Ausbeuten: HMPT/HOBt-Polymer: 6.7 g (81.7 % d. Th.). Aus dem Chlorwert von 7.18 % der Elementaranalyse errechnet sich, daß 42.8 % des Polymers mit HMPT beladen ist.
HMPT/HOSu-Polymer: 6.0 g (74.8 % d. Th.), 40.75 % Beladung nach Chlorwert von 6.83 %
TMU/HOBt-Polymer: 5.15 g (78.7 % d. Th.), 24.35 % Beladungsgrad nach Chlorwert von 3.83 %
TMU/HOSu-Polymer: 5.2 g (74.8 % d.Th.), 33.3 %

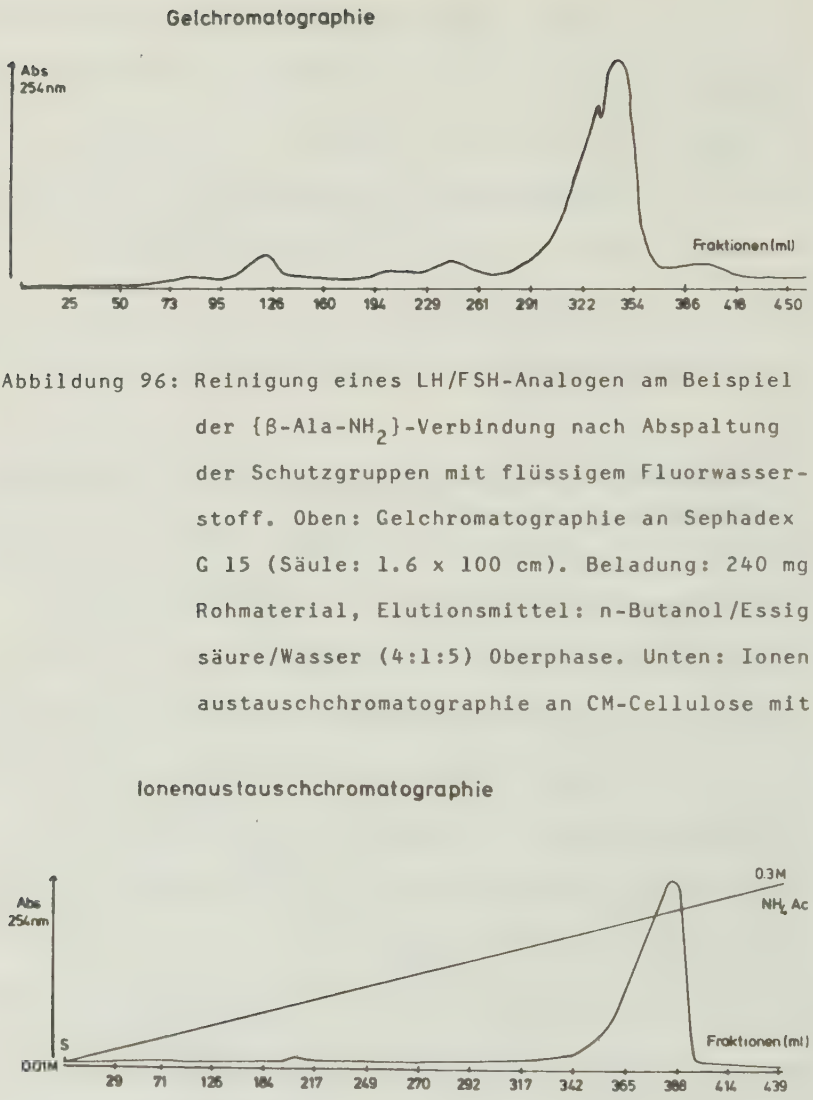


Abbildung 96: Reinigung eines LH/FSH-Analogen am Beispiel der {β-Ala-NH_2}-Verbindung nach Abspaltung der Schutzgruppen mit flüssigem Fluorwasserstoff. Oben: Gelchromatographie an Sephadex G 15 (Säule: 1.6 x 100 cm). Beladung: 240 mg Rohmaterial, Elutionsmittel: n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5) Oberphase. Unten: Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose mit Ammoniumacetat (0.01 - 0.3 M, pH 4.8 - 7.0). Säule: 1.6 x 70 cm.

14. Zusammenfassung

Das von Schally et al.und Guillemin et al. isolierte LH/FSH-"Releasing"-Hormon wird mit verschiedenen Kupplungstechniken und unter Zuhilfenahme verschiedener Synthesestrategien auf klassische Weise synthetisiert. Zur Charakterisierung der Zwischen- und Endprodukte wird vorwiegend die ^{13}C-NMR-Spektroskopie herangezogen. Zum Zwecke des Studiums der Struktur-Aktivitätsbeziehungen diese Moleküls werden Analoga mit agonistischen und antagonistischen Eigenschaften synthetisiert. Diese Verbindungen zeichnen sich dadurch aus, daß ihr "Backbone" gegenüber dem nativen Hormon durch den Einbau von β-Aminosäuren verändert wurde. Die Modifikationen werden in den Positionen 1, 2, 6, 9 und 10 vorgenommen und führt zu folgenden Verbindungen: h-Pyr^1-LH/FSH-RH, Ecg^1-LH/FSH-RH, (β-Ala^6)-LH/FSH-RH, (β-Ala-NH$_2$^{10})-LH/FSH-RH, (β-Ala^6, β-Ala-NH$_2$^{10})-LH/FSH-RH, (h-Pro^9)-LH/FSH-RH, (D-Phe^2, β-Ala^6)-LH/FSH-RH, (D-Phe^2, β-Ala-NH$_2$^{10})-LH/FSH-RH, (D-Phe^2, β-Ala^6, β-Ala-NH$_2$^{10})-LH/FSH-RH und (D-Phe^2, h-Pro^9)-LH/FSH-RH.

Im weiteren Verlauf der Arbeit werden neue Aminosäureschutzgruppen vom Sulfonamidtyp entwickelt und auf ihre Verwendbarkeit geprüft. Der als Guanidinoschutzgruppe des Arginins verwendete p-Methoxybenzolsulfonyl-rest wird sowohl als N$^{\alpha}$-Schutzgruppe von Aminosäuren als auch als Schutzgruppe für die δ-Aminofunktion des Ornithins bzw.

für die ε-Aminogruppe des Lysins sowie als Imidazolschutzgruppe des Histidins eingeführt.

Eine im Vergleich zu dieser Mbs-Gruppe leichter abspaltbaren Sulfonamidschutzgruppe wurde in dem 2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonyl (TIP)-Rest gefunden. Das Ausgangsmaterial dieser Schutzgruppe läßt sich einfach darstellen und unter den üblichen alkalischen Bedingungen unter Erhalt der optischen Aktivität leicht in die N^{α}-geschützten Aminosäuren Arginin als auch Histidin einführen. Ein weiterer Vorteil ergibt sich durch die voluminösen Isopropylreste. Man erreicht dadurch einen gewissen "sterischen" Schutz, außerdem wird durch die Lipophilie der Schutzgruppe die Extrahierbarkeit von Histidinderivaten und -peptiden in organische Phasen außerordentlich erleichtert. Die Verwendbarkeit der Schutzgruppe bei Peptidsynthesen wird durch die Synthesen von (γ-Abu^6)-LH/FSH-RH, Tuftsin sowie (Arg^6, Phe^7)-Methionin-Enkephalin demonstriert.

Eine weitere Schutzgruppe vom Sulfonamidtyp, die sich sowohl zum Guanidino-Schutz des Arginins als auch zum Imidazol-Schutz des Histidins verwenden läßt, ist die m-Trifluormethylbenzolsulfonyl-Gruppe.

Acyloxyphosphonium-Verbindungen zum Zwecke der Peptidknüpfung wurden zuerst von Castro et al. in Form des BOP-Reagenzes in die Peptidchemie eingeführt. Der Nachteil dieser Peptidverknüpfungsmethode waren die damit verbundenen

Nebenreaktionen und die teilweise Razemisierung der erhaltenen Peptide. Um diese Nachteile auszuschalten werden neue Kupplungsreagenzien auf der Basis des BOP-Reagenzes entwickelt. So konnte das Succinimido-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorphosphat, das 5-Norbornen-2.3-dicarbonsäureimido-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorphosphat, das 4-Oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazino-3-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorphosphat sowie das Phtalimido-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorphosphat dargestellt werden.

Diese, mit verschiedenen, die Razemisierung unterdrückenden Reste, versehenen Kupplungsreagenzien werden an verschiedenen Sequenzen des LH/FSH-"releasing"-Hormons sowie am Modellpeptid Z-Val-Gly-OEt getestet und in ihren Ausbeuten und ihrer Razemisierung mit den "klassischen" Kupplungsreagenzien wie DCCI/HOBt, Mischanhydrid, Aktivester und DPPA verglichen.

Den Acyloxyphosphonium-Verbindungen vergleichbar sind die sogenannten "Vi lsmeier-Hack-Reagenzien", die ebenfalls für die Peptidkupplung verwendet werden können. Auf der Basis dieser Verbindungen werden das O-(N-oxysuccinimido) N.N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat, O-(N-oxy-5-norbornen-2.3-dicarbonsäureimido)-N.N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat und das O-(N-oxy-phtalimido)-N.N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat als neue Kupplungsreagenzien synthetisiert und auf ihre Verwendbarkeit und Razemisierungs-

sicherheit getestet.

Die Kupplungsreagenzien beider Substanzklassen sind in der Ausbeute der Peptidkupplungen und ihrer Razemisierungssicherheit mit den klassischen Kupplungsreagenzien vergleichbar. Ihr besonderer Wert liegt in der Kürze der Reaktionszeit. Die meisten Kupplungen sind mit diesen Reagenzien innerhalb von zwei Stunden abgeschlossen.

Polymere Reagenzien gewinnen in der organischen Chemie immer größeren Raum. Deshalb werden sowohl die Verbindungen des Acyloxyphosphonium- als auch vom Vielsmeier-Hack-Typ mit sogenannten "Merrifield-Harzen verknüpft. Die so gewonnenen polymeren Kupplungsreagenzien werden wieder am Modellpeptid Z-Val-Gly-OEt getestet, zeigen aber im Vergleich zu den nicht polymeren Verbindungen eine deutlich niedrigere Ausbeute.

Wie in der Arbeit gezeigt wird, haben die Enkephaline gewisse Strukturähnlichkeiten mit dem LH/FSH-"Releasing"-Hormon. Mit Hilfe der oben beschriebenen Kupplungsreagenzien werden sowohl die nativen Enkephaline: Leucin-Enkephalin und Methionin-Enkephalin als auch die Derivate Met-Enkephalinamid, (Arg^6, Phe^7)-Met-Enkephalin, (Sar^3)-Enkephalinamid sowie (Ala^2, D-Tyr^3)-Enkephalinamid synthetisiert. Die Synthesen werden nach neuen Strategien nach der Fragmentkupplungsmethode durchgeführt. Dabei zeigt sich, daß die biologische Aktivität von Leu- und Met-Enkephalin

gemessen mit dem Meerschweinchen-Ileum-Test gegen Morphin als Standard, etwa den in der Literatur angegebenen Werten entspricht. Die Veränderung des Moleküls in Position 3 aber einen mehr oder minder starken Abfall der biologischen Aktivität zur Folge hat.

Bei den getesteten LH/FSH-"releasing"-Hormonen wird bedingt durch den Einbau von β-Aminosäuren, wie erwartet ein starker Abfall der biologischen Aktivität im Vergleich zum nativen Hormon festgestellt.

Die Enkephaline zeigen wie von Momany postuliert, LH/FSH-ausschüttende bzw. hemmende Wirkung, wobei den Verbindungen mit blockiertem C-Terminus agonistische, jenen mit freiem Carboxylende antagonistische Wirkung zukommt.

15. Literaturverzeichnis

1. J.C. Hinsey, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 5, 269 (1937)
2. J.D. Green, G.W. Harris, J. Physiol. (London) 108, 359 (1949)
3. G.W. Harris, Neutral Control of the pituitary gland, London (1955)
4. A.V. Schally, A. Arimura, Y. Baba, R.M.G. Nair, Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 393, (1971)
5. M. Amos, R. Burgus, R. Blackwell, W. Vale, R. Fellows, R. Guillemin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 205, (1971)
6. H.M. Fraser, J. Endocrinol., 63, 399 (1974)
7. M. Jutisz, Z. Naturforsch. 29 c, 105 (1974)
8. D. Gupta, Sexualmedizin 2, 68 (1974)
9. H. Matsuo, Y. Baba, R.M.G. Nair, A. Arimura, A.V. Schally, Biochem. Biophys. Res. Commun 43, 1334 (1971)
10. Y. Baba, H. Matsuo, A.V. Schally, Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 459 (1971)
11. R. Burgus, M. Butcher, M. Amoss, N. Ling, M. Monahan, J. Rivier, R. Fellows, R. Blackwell, W. Vale, R. Guillemin, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 278 (1972)
12. P.N. Lewis, F.A. Momany, H.A. Scheraga, Isr. J. chem. 11, 121 (1973)
13. A.W. Burgess, F.A.Momany, H.A. Scheraga, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 1456 (1973)
14. F.A. Momany, J. Amer. Chem. Soc. 98, 10, 2990, 2996

(1976)

15. M.J.D. Powell, Comput. J., 7, 155 (1964)
16. W.I. Zangwill, Comput. J., 10, 293 (1967)
17. F.A. Momany, C. Bowers, J.K. Chang in M. Goodman, J. Meienhofer, Peptides, Proc. of the 5th Amer. Pept. Symp. 1977, S. 292
18. J.K. Chang, R.H. Williams, A.J. Humphries, N.G. Johansson, K. Folkers, Biochem. Biophys. Res. Commun 47, 727 (1972)
19. Ph.L. Wessels, J. Feeney, H. Gregory, J.J. Gormley, J.Chem. Soc., Perk. Trans. II, 1691, (1973)
20. W.A. Gibbons, G. Nemethy, A. Stern, L.C. Craig, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 299 (1970)
21. J. Feeney, G.C.K. Roberts, J.P. Brown, A.S.V. Burgen, H. Gregory, J. Chem. Soc., Perk. Trans. II, 601, (1972)
22. R.J. Abraham, K.A. Mc Laughlan, Mol. Phys. 5, 513 (1962)
23. V.F. Bystrov, S.L. Portnova, V.T. Ivanov, Yu.A. Ovchinnikov, Tetrahedron 25, 493 (1969)
24. K.G.R. Pachler, Spectrochim. acta 20, 581 (1964)
25. H.Ogura, Y. Arata, S. Fujiwara, J. Mol. Spectrosc. 23, 76 (1967)
26. K.D. Kopple, M. Ohnishi, A. Go, Biochemistry 8, 4087 (1969)
27. I.C.P. Smith, R. Deslauriers, H. Saito, R.W. Walter C. Carrigan-Lagrange, H. McGregor, D. Sarantakis, Int. Conference of ESR- and NMR-Spectroscopy in Biology and Medicine New York 1972

28. R. Deslauriers, G.C. Levy, W.H. McGregor, D. Sarantakis, I.C.P. Smith, Biochemistry 14, 4335 (1975)

29. W. Horsley, H. Sternlicht, J.S. Cohen, J. Amer. Chem. Soc. 92, 680 (1970)

30. W. Voelter, G. Jung, E. Breitmeier, E. Bayer, Z. Naturforsch. 26 b, 213 (1971)

31. R. Deslauriers, C. Carrigou-Lagrange, A.M. Bellocq, I.C.P. Smith, FEBS-Letters 31, 59 (1973)

32. R. Deslauriers, W.H. McGregor, D. Sarantakis, I.C.P. Smith, Biochemistry 13, 3443 (1974)

33. R. Walter, K.U.M. Prassad, R. Deslauriers, I.C.P. Smith, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2086 (1973)

34. M. Christl, J.D. Roberts, J. Amer. Chem. Soc. 94, 4565 (1972)

35. J. Humphries, G. Fisher, Y-P. Wang, K. Folkers, C.Y. Bowers, Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 675 (1974)

36. R. Deslauriers, I.C.P. Smith in Topics in ^{13}C-NMR-Spectroscopy Vol II, ed. G.C. Levy, Wiley Intersci. New York 1975

37. P. Keim, R.A. Vigna, A.M. Nigen, J.S. Morrow, F.R.N. Gurd, J.biol. Chem. 249, 4149 (1974)

38. A. Allerhand, D. Doddrell, R. Komoroski, J. Chem. Phys. 55, 189 (1971)

39. G.C. Levy, Acc. chem. Res. 6, 16 (1973)

40. J.R. Cann, K. Channabasavaiah, J.M. Stewart, Biochemistry 18, 5776 (1979)

41. S. Mabrey, I.M. Klotz, Biochemistry 15, 234 (1976)

42. G. Holzwarth, P. Doty, J. Amer. Chem. Soc. 87,

218 (1965)

43. C. Tanford, K. Kawahara, S. Laperje, J. Amer. Chem. Soc 89, 729 (1967)

44. R.W. Woody, J. Polym. Sci., Macromol. Rev. 12, 181 (1977)

45. L. Terenius, A. Wahlstrom, Acta pharm. tox. 35, 55 (1974)

46. G.W. Pasternak, R. Goodman, S.H. Snyder, Life Sci. 16, 1765 (1975)

47. J. Hughes, T.W. Smith, H.W. Kosterlitz, L.A. Fothergill, B.A. Morgan, H.R. Morris, Nature 258, 577 (1975)

48. A. Goldstein, S. Tachibana, L.I. Lowney, M. Hunkapiller, L. Hood, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 6666 (1979)

49. K. Kangawa, Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 871 (1981)

50. J. Rosier, Y. Audigier, N. Ling, J. Cros, S. Udenfriend, Nature 288, 88 (1980)

51. P.C. Montecucchi, R. de Castiglione, S. Piani, L. Gozzini, V. Erspamer, Int. J. Pept. Prot. Res. 17, 275 (1981)

52. A.F. Bradbury, D.G. Smyth, C.R. Snell, Nature 260, 165 (1976)

53. J.L. de Coen, C. Humblet, M.H.J. Koch, FEBS-Letters 73, 38 (1977)

54. E. Ralston, J.L. de Coen, J. Mol. Biol. 83, 393 (1974)

55. Y. Isogai, G. Nemethy, H.A. Scheraga, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 414 (1977)

56. F.A. Momany, Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 1098 (1977)

57. F.A. Momany, R.F. McGuire, A.W. Burgess, H.A. Scheraga, J. Phys. Chem. 79, 2361 (1975)

58. P.N. Lewis, F.A. Momany, H.A. Scheraga, Biochim. Biophys. acta 303, 211 (1973)

59. B.P. Roques, C. Garbay-Jaurequiberry, R. Oberlin, M. Anteunis, A.K. Lala, Nature 262, 778 (1976)

60. C.R. Jones, W.A. Gibbons, V. Garsky, Nature 262, 779 (1976)

61. M. Anteunis, A.K. Lala, C. Garbay-Jaurequiberry, B.P. Roques, Biochemistry 16, 1462 (1977)

62. H.E. Bleich, A.R. Day, R.J. Freer, J.A. Glasel, Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 592 (1977)

63. M.T. Cung, M. Marraud, J. Néel, Macromolecules 7, 606 (1974)

64. T. Higashijima, J. Kobayashi, U. Nagai, T. Miyazawa Europ. J. Biochem. 97, 43 (1979)

65. J.H. Noggle, R.E. Schirmer, The Nuclear Overhauser Effect, Acad. Press, NY 1971

66. S. Combrisson, B.P. Roques, R. Oberlin, Tetrahedron Letters 38, 3455 (1976)

67. E.R. Stimson, Y.C. Meinwald, H.A. Scheraga, Biochemistry 18, 1661 (1979)

68. V. Bystrov, F. Gavrilov, Y.D. Ivanov, Yu.A. Ovchinnikov, Europ. J. Biochem. 78, 63 (1977)

69. V. Bystrov, Y.D. Gavrilov, V.N. Solkan, J. Magn. Res. 19, 123 (1975)

70. K.D. Kopple, G.R. Wiley, R. Tanke, Biopolymers 12, 627 (1973)

71. F.W. Wehrli, T. Wirthlin, Interpret. of Carbon-13-NMR-Spectra, pp. 56-59, Heyden Press NY. (1976)

72. P.E. Hansen, J. Feeney, G.C.K. Roberts, J. Magn. Res. 17, 249 (1975); M.A.S. Spirtes, R.W. Schwartz, W.L. Mattice, D.H. Coy, Biochem Biophys. Res. Commun. 81, 602 (1978)

73. S.L. Han, E.R. Stimson, F.R. Maxfield, H.A. Scheraga Int. J. Pept. Prot. Res. 16, 173 (1980)

74. J.L. Koenig, J. Polym. Sci. D, 59 (1972)

75. T.J. Yu, J.L. Lippert, W.L. Peticolas, Biopolymers 12, 2161 (1973)

76. J. Bandekar, S. Krimm, Biopolmers 19, 31 (1980)

77. J. Bandekar, S. Krimm, Proc. Nat. Sci. USA 76, 774 (1979)

78. M.N. Siamwiza, R.C. Lord, M.C. Chen, T. Takamatsu, I. Hareda, H. Matsuura, T Shimanouchi, Biochemistry 14, 4870 (1975)

79. G.D. Smith, J.F. Griffin, Science 199, 1214 (1978)

80. M. Monahan, M.S. Amoss, H.A. Anderson, W. Vale, Biochemistry 12, 4616 (1973)

81. J. Rivier, N. Ling, M. Monahan, C. Rivier, M. Brown W. Vale, Peptides, Chemistry, Structure and Biology, Proc. of 4th Amer. Peptide Symp. 1975, NY, p. 871

82. D.H. Coy, J.A. Vilchez-Martinez, E.J. Coy, A.V. Schally J. Med. Chem. 19, 423 (1976)

83. M. Fujino, S. Kobayashi, M. Obayashi, S. Shinagawa, T. Fukuda, C. Kitada, R. Nakayama, I. Yamazaki, Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 863 (1972)

84. W. Vale, G. Grant, J. Rivier, M. Monahan, M. Amoss, R. Blackwell, R. Burgus, R. Guillemin, Science 176, 933 (1972)

85. L. Ferland, F. Labrie, M. Savary, M. Beaulieu, D.H. Coy, E.J. Coy, A.V. Schally, Clin Endocrinol. 5, Suppl. 279 (1976)

86. R.W.A. Rees, T.J. Foell, S.Y. Chai, N. Grant, A.V. Schally, A. Arimura, W.H. Carter, T.W. Redding, J. Med. Chem 17, 1016 (1974)

87. R. Geiger, W. König, H. Wissmann, G. Jaeger, J. Sandow, N. Yanaihara, C. Yanaihara, T. Hashimoto, S. Sakagami, Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 366 (1972)

88. K. Nicolics, D.H. Coy, J.A. Vilchez-Martinez, A.V. Schally, Int. J. Pept. Prot. Res. 9 57 (1977)

89. J.M. Walker, G.G. Dentson, C.A. Sandman, D.H. Coy, A.V. Schally, A.J. Kastin, Science 196, 86 (1977)

90. G.N. Woodroff, P.S. McCarthy, M.J. Turnbull, J.S. Shaw, 7th Int. Congress of Pharmacol., Paris 1978 Abstr. N^{o} 441

91. D.H. Coy, A.J. Kastin, A.V. Schally, O. Morin, N.G. Caron, F. Labrie, J.M. Walker, R. Fertel, G.G. Berntson, C.A. Sandman, Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 632 (1976)

92. C.B. Pert, A. Pert, J.-K. Chang, B.T.W. Fong, Science 194, 330 (1976)

93. J. Rossier, Y. Audigier, N. Ling, J. Gros, S. Udenfriend, Nature 288, 88 (1980)

94. E. Wünsch, Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie Bd. XV/2

95. E. Wünsch, Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie Bd. XV/1

96. A. Hubbuch, Kontakte Merck 3, 14 (1979)

97. E.E. Büllesbach, Kontakte Merck 1, 23 (1980)

98. R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 (1963)

99. R. Geiger, W. König, H. Wissmann, K. Geisen, F. Enzmann, Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 767 (1971)

100. J.K. Chang, H. Sievertson, B. Currie, C. Bogentoft, K. Folkers, C.Y. Bowers, J. Med. Chem. 15, 623 (1972)

101. Yanaihara N. + C., M. Sakagami, K. Tsuji, T. Hashimoto, T. Kaneko, H. Oka, A.V. Schally, A. Arimura, T.W. Redding, J. Med. Chem. 16, 373 (1973)

102. M. Fujino, T. Fukuda, S. Kobayashi, M. Obayashi, Chem. Pharm. Bull. 21, 87 (1973)

103. G. Flouret, W.H. Arnold, J.W. Cole, R.L. Morgan, W.F. White, M.T. Hedlund, R.H. Rippel, J. Med. Chem. 16, 369 (1973)

104. S. Bajusz, A. Turan, I. Fauszl, A. Juhász, Peptides 1972, Proc. 12th Europ. Peptide Symp., Reinhardsbrunn S. 91 (H.D. Jakubke, H. Hanson, North Holland Amsterdam 1973)

105. H. Immer, V.R. Nelson, C. Revesz, K. Sestanj, M. Götz, J. Med. Chem. 17, 1060 (1974)

106. D.J. Schafer, A.D. Black, J.D. Bower, D.B. Crighton, J. Med. Chem. 18, 613 (1975)

107. K. Shigezane, S. Hatsuno, N. Takamura, T. Mizoguchi S. Sugasawa, Chem. Pharm. Bull. 23, 2696 (1975)

108. R. Matsueda, H. Maruyama, E. Kitazawa, H. Takahagi, T. Mukaiyama, Bull. Chem. Soc. Japan 46, 3240 (1973)

109. E. Kasafirek, M. Semonsky, K. Hruska, Z. Veznik, Collec. Czech. Chem. Commun. 42, 2018 (1977)

110. E. Jaeger, P. Thamm, S. Knof, E. Wünsch, M. Löw, L. Kisfaludy, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1617 (1978); E. Jaeger, P. Thamm, S. Knof, E. Wünsch Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1629 (1978)

111. C.H. Li, D. Yamashiro, J. Org. Chem. 38, 2594 (1973)

112. R.A. Boissonas, St. Gutmann, Helv. Chim. Acta 41, 1867, (1958)

113. J.M. Stewart, U.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W Freeman & Co., San Francisco 1969

114. V. du Vignaud, J. Amer. Chem. Soc. 52, 4500 (1930)

115. S. Sakakibara, Bull. Chem. Soc. Japan 41, 1273 (1968) S. Sakakibara, Bull. Chem. Soc. Japan 40, 2164 (1967)

116. O. Nishimura, M. Fujino, Chem. Pharm. Bull. 24, 1568 (1976)

117. H. Echner, Diplomarbeit, Tübingen 1976

118. F. Weygand, W. Steglich, P. Pietta, Tetrahedron Letters 3751 (1966)

119. T. Shioiri, K. Ninomiya, S. Yamada, J. Amer. Chem. Soc. 94, 6204 (1972)

120. S. Yamada, N. Ikota, T. Shioiri, S. Tachibana, J. Amer. Chem. Soc. 97, 7174 (1975)

121. P. Kurath, A.M. Thomas, Helv. Chim. Acta 56, 1656 (1973)

122. T. Wieland, H. Bernhard, Liebigs Ann. Chem. 572, 190 (1951)

123. R.A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta 34, 874 (1951)

124. J.R. Vaughan, J. Amer. Chem. Soc. 73, 3547 (1951)

125. L. Balàspiri, B. Penke, Gy. Papp, Gy. Dombi, K. Kovács, Helv. Chim. Acta 58, 970 (1975)

126. T. Wakabayashi, K. Watanabe, Y. Kato, Synth. Commun. 7, 239 (1977)

127. J.-M. Cassal, A. Fürst, W. Meier, Helv. Chim. Acta 59, 1917 (1976)

128. H.H. Bosshard, R. Mory, M. Schmid, Hch. Zollinger Helv. Chim. Acta 42, 1653 (1959)

129. F. Reindel, W. Hoppe, Chem. Ber. 87, 1103 (1954)

130. R.A. Heacock, M.E. Mahon, J. Chrom. 17, 338 (1965)

131. N.+C. Yanaihara, K. Tsuji, T. Hashimoto, T. Kaneko, T.+H. Oka, A. Arimura, A.V. Schally, Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 165 (1973)

132. K. Nicolics, D.H.+E.J. Coy, J.A. Vilchez-Martinez, A.V. Schally, Int. J. Pept. Prot. Res. 9, 57 (1977)

133. K.U. Prassad, R.W. Roeske, F.L. Weitl, J.A. Vilchez-Martinez, A.V. Schally, J. Med. Chem. 19, 492 (1976)

134. Y. Hirotsu, D.H.+E.J. Coy, A.V. Schally, Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 277 (1974)

135. J. Rudinger, H. Farkasová, Collec. Czech. Chem. Commun. 28, 2941 (1963)

136. T. Wkabayashi, M. Saito, Tetrahedron Letters 93 (1977)

137. J.C. Hubert, J.B.PA. Wijnberg, W.N. Speckamp, Tetrahedron 31, 1437 (1975)

138. J.J.J. de Boer, W.N. Speckamp, Tetrahedron Letters 4039 (1975)

139. Z.B.C. Liebermann, Chem. Ber. 24, 606 (1891)

140. R. Willstätter, A. Bode, Chem. Ber. 34, 519 (1901)

141. R. Schwyzer, C.H. Li, Nature 182, 1669 (1958); E. Schnabel, C.H. Li, J. Amer. Chem. Soc. 82, 4576 (1960)

142. K. Hofmann, H. Gajima. E.T. Schwarz, J. Amer. Chem. Soc. 83, 2289 (1961)

143. P.G. Katsoyannis, Amer. J. Med. 40, 662 (1966)

144. T. Baba, H. Sugiyama, S. Seto, Chem. Pharm. Bull. 21, 207 (1973)

145. S. Sano, S. Kawanishi, J. Amer. Chem. Soc. 97, 3489 (1975)

146. R.S. Feinberg, R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 97, 3485 (1975)

147. A.C. Kurtz, J. biol. Chem. 140, 705 (1941)

148. T. Fujii, S. Sakakibara, Bull. Chem. Soc. Japan 42, 1466 (1969)

149. T. Fujii, S. Sakakibara, Bull. Chem. Soc. Japan 47, 3146 (1974)

150. W. König, R. Geiger, Chem. Ber. 103, 788 (1970)

151. K. Kitagawa, K. Kitade, Y. Akita, S. Funakoshi, Y. Kiso, N. Fujii, H. Yajima, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 955 (1979)

152. V. du Vigneaud, O.K. Behrens, J. biol. Chem. 117, 27 (1937)

153. E. Fischer, Chem. Ber. 48, 93 (1915)

154. H. Yajima, M. Takeyama, J. Kanaki, O. Nishimura, M. Fujino, Chem. Pharm. Bull 26, 3752 (1978)

155. H. Yajima, M. Takeyama, J. Kanaki, M. Mitani, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 668 (1980)

156. M. Fujino, O. Nishimura, M. Wakimasu, Ch. Kitada, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 668 (1980)

157. T. Fukuda, Ch. Kitada, M. Fujino, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 220 (1978)

158. H.G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 88, 832 (1966)

159. U. Weber, Z. Naturforsch. 31 b, 1157 (1976)

160. H. Eckstein, Liebigs Ann. Chem. 12, 1289 (1976)

161. V.A. Najjar, K. Nishioka, Nature 228, 627 (1970)

162. S. Nozaki, K. Hisatune, I. Muramatsu, Bull. Chem. Soc. Japan 50, 422 (1977)

163. F. Lipmann, Adv. Enzymol. 1, 99, 152 (1941)

164. Yu.V. Mitin, O.V. Glinskaya, Tetrahedron Letters 5267 (1969)

165. T. Mukaiyama, J. Amer. Chem. Soc. 90, 4490 (1968)

166. G. Gawne, G.W. Kenner, R.C. Sheppard, J. Amer. Chem. Soc. 91, 5669 (1969)

167. B. Castro, J.R. Dormoy, Tetrahedron Letters 3243 (1973)

168. B. Castro, J.R. Dormoy, Tetrahedron Letters 4747 (1972)

169. B. Castro, J.R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, Tetrahedron Letters 1219 (1975)

170. B. Castro, J. R. Dormoy, B. Dourtoglou, G. Evin, C. Selve, J.C. Ziegler, Synthesis 751 (1976)

171. J.R. Dormoy, B. Castro, Tetrahedron Letters 3321 (1979)

172. H. Teichmann, CH. Auerswald, G. Engelhardt, Z. prakt. Chem. 321, 835 (1979)

173. S. Poignant, J.R. Gauvreau, G.J. Martin, Can. J. Chem. 58, 946 (1980)

174. E. Wünsch, F. Drees, Chem. Ber. 99, 110 (1966), F. Weygand, D. Hoffmann, E. Wünsch, Z. Naturforsch. 21 b, 426 (1966)

175. M. Fujino, Chem. Pharm. Bull. 22, 1857 (1974); Ch. Kitada, M. Fujino, Chem. Pharm. Bull. 26, 585 (1978)

176. W. König, R. Geiger, Chem. Ber. 103, 2034 (1970)

177. G.H.L. Nefkens, G.I. Tesser, R.F. Nivard, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 81, 683 (1962)

178. G. Hazebroucq, Ann. Pharm. franc. 24, 793 (1966)

179. D.R. Hepburn, H.R. Hudson, J. Chem. Soc., Perkin Trans. I 754 (1976)

180. V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gros, Tetrahedron Letters 1269 (1978)

181. H.Frank, G.J. Nicholson, E. Bayer, J. Chrom. Sci. 15, 174 (1977)

182. G.J. Nicholson, H. Frank, E. Bayer, HRC + CC 2, 411 (1979)

183. N.W. Williams, G.T. Young, J. Chem. Soc. 881 (1963)

184. M. Itoh, H. Nosuma, J. Notami, D. Hagiwara, K. Takai, Tetrahedron Letters 3089 (1974)

185. B. Castro, J.R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, J. Chem. Res. (M.) 2118 (1977)

186. L.A. Carpino, G.Y. Han, J. Amer. Chem. Soc. 92, 5748 (1970)

187. H. Horn, Dissertation Tübingen 1981, S. 25-27

188. D.A. McLaren, Austral. J. Chem. 25, 1293 (1975)

189. E. Dane, T. Dockner, Angew. Chem. 76, 342 (1964)

190. N. Ling, R. Guillemin, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 3308 (1976)

191. J.D. Bower, K.P. Guest, B.A. Morgan, J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 1488 (1976)

192. A.S. Stern, R.V. Lewis, S. Kimura, J. Rossier, L.D. Gerber, L. Brink, St. Stein, S. Udenfriend, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 6680 (1979)

193. ist identisch mit 50.

194. J.K. Chang, B.T.W. Fong, A. + C.B. Pert, Life Sci. 18, 1473 (1976)

195. D. Yamashiro, C.H. Li, J. Amer. Chem. Soc. 95, 1310 (1972)

196. W. Voelter, pers. Mitteilung

197. M. Brenner, A. Niederwieser, G. Pataki in E. Stahl

Dünnschichtchromatographie, 2.Aufl., S. 712, 842, Springer Berlin, Heidelberg, New York 1962

198. Firmenschrift Pharmacia: Gel-Filtration in Theorie und Praxis

199. H. Ertel, L. Haimer, J. Chrom. 7, 268 (1962)

200. E. von Arx, R. Neher, J. Chrom. 12, 329 (1963)

201. E. Bujard in G. Pataki: DC in der Aminosäure- und Peptidchemie S. 109, W. de Gruyter & Co., Berlin 1966

202. J.A. Riddick, W.B. Bunger, Organic Solvents, Phys. Properties and Methods of Purification, NY. (1970)

203. L. Carpino, C.A. Giza, B.A. Carpino, J. Amer. Chem. Soc. 81,955 (1957)

204. J.B. Greenstein, M. Winitz, Chemistry of Amino acids, J. Wiley & Sons Inc., NY. 1961

205. W. König, R. Geiger, Chem. Ber. 103. 788 (1970)

206. E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. 702, 188 (1967)

207. W. Grassmann, E. Wünsch, Chem. Ber. 91, 462 (1958)

208. A.F. Olechnowitz, G. Zimmermann, Angew. Chem. 67, 209, (1955)

209. T. Curtius, F. Goebel, J. prakt. Chem. 37, 150 (1888)

210. G.W. Anderson, J. Amer. Chem. Soc. 75, 6081 (1953)

211. M. Brenner, W. Huber, Helv. Chim. Acta 36, 1109 (1953)

212. E. Wünsch, G. Fries, A. Zwick, Chem. Ber. 91, 542 (1958)

213. W.J. Le Quesne, G.T. Young, J. Chem. Soc.(London), 1954, 1959 (1950)

214. H. Gibian, E. Klieger, Liebigs Ann. Chem. 640, 145 (1961)

215. S. Goldschmidt, C. Jutz, Chem. Ber. 86, 1116 (1953)

216. P. Kurath, A.M. Thomas, Helv. Chim. Acta 56, 1656 (1972)

217. Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Phosphorverbindungen S. 280

218. P.H. Bentley, J. Chem. Soc. 6130 (1964)

219. T. Wakabayashi, Y. Kato, K. Watanabe, Chem. Letters 1283 (1976)

220. M.S. Morgan, L.H. Cretcher, J. Amer. Chem. Soc. 70,

221. S. Stirring, Chem. Abstracts 54, 356 h

222. Organikum, 15. Aufl., S. 686, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1981

223. Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Synthese von Peptiden Bd. 15/1, S. 472

224. J. Coggins, R. Demayo, N.L. Benoiton, Can. J. Chem. 48, 385 (1970)

225. L.A. Carpino, J. Org. Chem. 45, 4520 (1980)

226. L.A. Carpino, G.Y. Han, J. Org. Chem. 37, 3404 (1972)

227. R.W. Roeske, Chem. and Industry 1121 (1959)

228. M. Brenner, R.W. Pfister, Helv. Chim. Acta 34, 2085 (1951)

229. C. Schattenkerk, I. Voskuyl-Holtkamp, R. Bokhorst, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 92, 92 (1973)

230. D. Ben Ishai, E. Katchalski, J. Amer. Chem. Soc. 74, 3688 (1952)

231. E. Wünsch, F. Drees, Chem. Ber. 100, 816 (1967)

232. J.D. Bower, K.P. Guest, B.A. Morgan, J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 2488 (1976)

233. M. Zaoral, Collec. Czech. Chem. Commun. 32, 843 (1967)

234. K. Okawa, Bull. Chem. Soc. Japan 30, 976 (1957)

235. D. Harrison, A.C.B. Smith, J. Chem. Soc. 2157 (1960)

236. A.W. Scott, B.L. Wood, J. Org. Chem. 7, 515 (1942)

237. H.S. Mosher, J.E. Tessieri, J. Amer. Chem. Soc. 73, 4925 (1951)

238. A. Patchornik, M.A. Kraus, Pure and Appl. Chem. 43, 503 (1975)

239. A. Patchornik, M.A. Kraus, Pure and Appl. Chem. 46, 183 (1976)

240. N.M. Weinshenker, C.M. Shen, Tetrahedron Letters 3281, 3285 (1972)

241. Y. Wolman, S. Kivity, M. Frankel, J. Chem. Soc., Chem. Commun 629 (1967)

242. M. Fridkin, A. Patchornik, E. Katchalski, Peptides 1969, Proc. 10th Europ. Symp. p. 166, North Holland. Amsterdam

243. R.E. Williams, J. Braun, D.R. Lauren, Polmer Reprints 13, 823 (1972)

244. M. Mutter, Tetrahedron Letters 2839, 2843 (1978)

245. M. Tomoi, T. Takubo, M. Ikeda, H. Kahiuchi, Chem. Letters 473 (1976)

246. Y. Leroux, H. Normant, Compt. Rend. Serie C, 241 (1977)

247. M. Tomoi, M. Ikeda, H. Kakiuchi, Tetrahedron Letters 3757 (1978)

248. St.L. Regen, A. Nigam, J.J. Besse, Tetrahedron Letters 2757 (1978)

249. J.E. Gardiner, B.A. Kilby, J. Chem. Soc. (London) 1770 (1950)

250. R.L. Arceneaux, J.G. Frick, E.K. Leonhard, J.D. Reid, J. Org. Chem. 24, 1419 (1959)

251. G. Snatzke, Optical Rotatory Dispersion and Circular-Dichroism in Organic Chemistry, Heyden & Son, London 1967

252. B. Jirgensons, Optical Rotatory Dispersion of Proteins and Macromolecules, Springer Verlag, Berlin 1969

253. E.E. Barnes, W.T. Simpson, J. Chem. Phys. 39, 670. (1963)

254. A.N. Glazer, K. Rosenheck, J. Biol. Chem. 237, 3674 (1962)

255. C. Cohen, Nature 175, 129 (1955)

256. G.M. Holzwarth, W.B. Gratzer, P. Doty, J. Amer. Chem. Soc. 84, 3194 (1962)

257. G.M. Holzwarth, P. Doty, J. Amer. Chem. Soc. 87, 218 (1965)

258. C.M. Deber, F.A. Bovey, J.P. Carcer, E.R. Blout, J. Amer. Chem. Soc. 92, 6191 (1970)

259. G.D. Fasman, Poly-α-Aminoacids, Protein Models for Conformational Studies, M. Dekker, New York 1967

260. S. Beychok, Ann. Rev. Biochem. 37, 437 (1968)

261. W.B. Gratzer, D.A. Cowburn, Nature 222, 426 (1969)

262. P. Urnes, P. Doty, Adv. Prot. Chem. 16, 401 (1961)

263. W. Moffit, J.T. Yang, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 42, 596 (1956)

264. R.W. Woody, J. Tinoco, J. Chem. Phys. 46, 4927 (1967)

265. E.R. Blout, J. Schmier, N.S. Simmonds, J. Amer. Chem. Soc. 84, 3193 (1962)

266. E.S. Pysh, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 56, 825 (1966)

267. S. Beychok, Poly-α-Aminoacids, G.D. Fasman, M. Dekker New York 1967, S. 293

268. M. Legrand, R. Viennet, Bull. Chim. Soc. France,679 (1965)

269. M.A. Spirtes, R.W. Schwartz, W.L. Mattice, D.H. Coy, Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 602 (1978)

270. H.W. Kosterlitz, A.J. Watt, British J. Pharmac. Chemother. 33, 266 (1968)

271. E. Lundanes, K. Tsuji, G. Rampold, M. Ohta, K. Folkers, Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 827 (1980)

272. D. Gupta, W. Voelter, Hypothalamic Hormones-Chemistry, Physiology and Clinical Applications, Proc. 2nd Europ. Coll. of Hypothalamic Hormones, Tübingen 1976, S. 93, Verlag Chemie Weinheim

273. V. Brantl, H. Teschemacher, A. Henschen, F. Lottspeich, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1211 (1979)

274. A. Henschen, F. Lottspeich, V. Brantl, H. Teschemacher, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1217 (1979)

275. A. Henschen, F. Lottspeich, V. Brantl, H. Teschemacher in Structure and activity of Natural Peptides, Ed. by W. Voelter, G. Weitzel, W. de Gruyter, Berlin-New York 1979

276. J.D. Belluzzi, L. Stein, Nature 266, 556 (1977)

277. E. Wei, H. Loh, Science 193, 1262 (1976)

278. G. Ungar, A.L. Ungar, D.H. Malin, D. Sarantakis, Psychoneuroendocrinology 2, 1 (1977)

279. A. Lampert, M. Nirenberg, W.A. Klee, Proc. Nat. Acad. Sci 73, 3165 (1976)

280. P.B. Bradley, I. Briggs, R.J. Gayton, L.A. Lambert, Nature 261, 425 (1976) ; J.P. Gent, J.H. Wolstencroft, Nature 261, 427 (1976)

281. C.Y. Bowers, B.T. Fong, J.K. Chang, Abstract ≡ 212, FASEB Meeting 1977, Chicago, Ill.

282. C.Y. Bowers, J.K. Chang, F.A. Momany, Y. Lam, R. Knudsen, K. Folkers, Abstract ≡ 000, Endocrinology Meeting 1977, London, England

283. N. Merks, F. Stern, Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 1458 (1974)

284. E. Bayer, H. Hagenmaier, G. Jung, W. Parr, H. Eckstein, P. Hunziker, R.E. Sievers, Peptides 1971, S. 65

285. R.S. Feinberg, R.B. Merrifield, Tetrahedron 30, 3209 (1974)

286. J. Stewart, J. Macromol. Sci. Chem. A 10, 259 (1976)

287. S.B.H. Kent, R.B. Merrifield, Isrl. J. Chem. 17, 243 (1978)

288. S.B.H. Kent, A.R. Mitchell, M. Engelhard, R.B. Merrifield, Proc. Nat. Sci. USA 76, 2180 (1979)

289. M.E. Clubb, P.M. Scopes, G.T. Young, Chimia 14, 373 (1960)

290. M. Bodansky, J.C. Shecham, Chem. & Ind. 1960, 1268

291. E. Schröder, K. Lübke, The Peptides, Academ. Press 1965, p. 167

292. B. Iselin, Proc. 6 th. Europ. Peptide Symp., Athens, Pergamon Press 1966, p. 27

293. H. Künzi, M. Manneberg, R.O. Studer, Helv. Chim. Acta 57, 566 (1974)

L E B E N S L A U F

Persönliche Daten:	Hartmut Friedrich Echner geboren am 27. Februar 1947 in Konstanz Eltern: Theo Echner, Irmgard Echner, geb. Fuß
Schulischer Werdegang:	1953-1957 Volksschule Konstanz 1957-1961 Suso-Gymnasium Konstanz 1961-1962 Stephansschule 1962-1965 Höhere Handelsschule 1965-1967 Wirtschafts-Oberschule Abschluß: Gymnasialabitur an der Wirtschafts-Oberschule Konstanz
Im Anschluß an das Abitur:	Oktober 1967-März 1969 Ableistung des Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr in Stetten a. k. M.
WS. 1969:	Beginn des Studiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen im Fach Chemie
1972:	Ablegung des Vordiploms
1975:	Mündliche Hauptdiplomprüfung
November 1975-November 1976	Diplomarbeit: Synthese von Tetrapeptiden mit der Wirkung des LH/

	FSH-freisetzenden Hormons.
November 1976- September 1979	Beginn der Doktorarbeit
September 1979- September 1980	Tätigkeit als wissenschaftlicher Angestellter: Entwicklung von chromogenen Substraten zum Nachweis von Serinproteasen
September 1980- September 1981	Tätigkeit als wissenschaftlicher Angestellter: Entwicklung von chromogenen Substraten zum Nachweis der C_1-Esterase
September 1981- Dezember 1982	Fortsetzung und Beendigung der Doktorarbeit
ab Dezember 1982	Wissenschaflicher Assistent im Großen Physiologischen Praktikum

Meine akademischen Lehrer waren:

M. Baumann, E. Bayer, W. Braun, E. Breitmaier, M. Brendle, G. Gauglitz, F. Gönnenwein, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, R. Hamm, M. Hanack, G. Jung, S. Kemmler-Sack, W.A. König, W. Kraus, P. Krauß, H. Krüger, D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, J.P. Lorenz, H. Machleidt, H. Mauser, H. Meier, E. Müller, M. Mutter, H. Oberhammer, D. Oelkrug, G. Opitz, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Rau, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, W. Schweizer, F.F. Seelig, V. Schurig, H. Stegmann, J. Strähle, E. Stumpp, H. Suhr, W. Voelter, W. Zeil, K.P. Zeller

Folgenden Damen und Herren an den Service-Stationen des Hauses bin ich zu Dank verpflichtet:

IR-Spektroskopie:	Frau Förstel
Massenspektrometrie:	Herrn H. Bartholomä, Herrn G. Nicholson
NMR-Spektroskopie:	Herrn Dr. Albert
	Herrn Dr. Fuchs
	Herrn B. Maier
Aminosäureanalyse und CD-Spektren:	Frau Munari
Racemattrennung:	Dipl.-Chem. J. Müller
Elementaranalyse:	Herrn Wurmstich
	Frau Seifried

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45